

Université de Sherbrooke

Développement de ligands à la protéase adénovirale
à l'aide de répertoires de peptides exprimés
sur phages filamenteux

par
Hélène Arsenault
Département de microbiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.)
Le 7 décembre 1993



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-89955-7

Canada

Nom HELENE ARSENAULT

Dissertation Abstracts International est organisé en catégories de sujets. Veuillez s.v.p. choisir le sujet qui décrit le mieux votre thèse et inscrivez le code numérique approprié dans l'espace réservé ci-dessous.

BIOLOGIE LECU RL DES ADENOVIRUS

SUJET

0307 **U·M·I**

CODE DE SUJET

Catégories par sujets

HUMANITÉS ET SCIENCES SOCIALES

COMMUNICATIONS ET LES ARTS

Architecture	0729
Beaux-arts	0357
Bibliothéconomie	0399
Cinéma	0900
Communication verbale	0459
Communications	0708
Danse	0378
Histoire de l'art	0377
Journalisme	0391
Musique	0413
Sciences de l'information	0723
Théâtre	0465

ÉDUCATION

Généralités	515
Administration	0514
Art	0273
Collèges communautaires	0275
Commerce	0688
Économie domestique	0278
Éducation permanente	0516
Éducation préscolaire	0518
Éducation sanitaire	0680
Enseignement agricole	0517
Enseignement bilingue et multiculturel	0282
Enseignement industriel	0521
Enseignement primaire	0524
Enseignement professionnelle	0747
Enseignement religieux	0527
Enseignement secondaire	0533
Enseignement spécial	0529
Enseignement supérieur	0745
Évaluation	0288
Finances	0277
Formation des enseignants	0530
Histoire de l'éducation	0520
Langues et littérature	0279

Lecture	0535
Mathématiques	0280
Musique	0522
Orientation et consultation	0519
Philosophie de l'éducation	0998
Physique	0523
Programmes d'études et enseignement	0727
Psychologie	0525
Sciences	0714
Sciences sociales	0534
Sociologie de l'éducation	0340
Technologie	0710

LANGUE, LITTÉRATURE ET LINGUISTIQUE

Langues	
Généralités	0679
Anciennes	0289
Linguistique	0290
Modernes	0291
Littérature	
Généralités	0401
Anciennes	0294
Comparées	0295
Médiévale	0297
Moderne	0298
Africaine	0316
Américaine	0591
Anglaise	0593
Asiatique	0305
Canadienne (Anglaise)	0352
Canadienne (Française)	0355
Germanique	0311
Latino-américaine	0312
Moyen-orientale	0315
Romane	0313
Slave et est-européenne	0314

PHILOSOPHIE, RELIGION ET THÉOLOGIE

Philosophie	0422
Religion	
Généralités	0318
Clergé	0319
Études bibliques	0321
Histoire des religions	0320
Philosophie de la religion	0322
Théologie	0469

SCIENCES SOCIALES

Anthropologie	
Archéologie	0324
Culturelle	0326
Physique	0327
Droit	0398
Économie	
Généralités	0501
Commerce Affaires	0505
Économie agricole	0503
Économie du travail	0510
Finances	0508
Histoire	0509
Théorie	0511
Études américaines	0323
Études canadiennes	0385
Études féministes	0453
Folklore	0358
Géographie	0366
Gerontologie	0351
Gestion des affaires	
Généralités	0310
Administration	0454
Banques	0770
Comptabilité	0272
Marketing	0338
Histoire	
Histoire générale	0578

Ancienne	0579
Médiévale	058
Moderne	0582
Histoire des nations	328
Africaine	0331
Canadienne	0334
États-Unis	0337
Européenne	0335
Moyen-orientale	033
Latino-américaine	0336
Asie, Australie et Océanie	0332
Histoire des sciences	0585
Loisirs	0814
Planification urbaine et régionale	0999
Science politique	
Généralités	0615
Administration publique	067
Droit et relations internationales	0616
Sociologie	
Généralités	0626
Aide et bien-être social	0630
Criminologie et établissements pénitentiaires	0627
Démographie	0938
Études de l'industrial et de la famille	628
Études des relations interethniques et des relations raciales	063
Structure et développement social	0700
Théorie et méthodes	0344
Travail et relations industrielles	629
Transports	079
Travail social	0452

SCIENCES ET INGÉNIERIE

SCIENCES BIOLOGIQUES

Agriculture	
Généralités	0473
Agronomie	0285
Alimentation et technologie alimentaire	0359
Culture	0479
Élevage et alimentation	0475
Exploitation des pêcheries	0777
Pathologie animale	0476
Pathologie végétale	0480
Physiologie végétale	0817
Sylviculture et faune	0478
Technologie du bois	0746
Biologie	
Généralités	0306
Anatomie	0287
Biologie (Statistiques)	0308
Biologie moléculaire	0307
Botanique	0309
Cellule	0379
Écologie	0329
Entomologie	0353
Génétique	0369
Immunologie	0793
Microbiologie	0410
Neurologie	0317
Océanographie	0416
Physiologie	0433
Radiation	0821
Science vétérinaire	0778
Zoologie	0472
Biophysique	
Généralités	0786
Médicale	0760

SCIENCES DE LA TERRE

Biogéochimie	0425
Géochimie	0996
Géodésie	0370
Géographie physique	0368

Géologie	0372
Géophysique	0373
Hydrologie	0388
Minéralogie	0411
Océanographie physique	0415
Paleobotanique	0345
Paleoécologie	0426
Paleontologie	0418
Paleozoologie	0985
Palynologie	0427

SCIENCES DE LA SANTÉ ET DE L'ENVIRONNEMENT

Économie domestique	0386
Sciences de l'environnement	0768
Sciences de la santé	
Généralités	0566
Administration des hôpitaux	0769
Alimentation et nutrition	0570
Audiologie	0300
Chimiothérapie	0992
Dentisterie	0567
Développement humain	0758
Enseignement	0350
Immunologie	0982
Loisirs	0575
Médecine du travail et thérapie	0354
Médecine et chirurgie	0564
Obstétrique et gynécologie	0380
Ophthalmologie	0381
Orthophonie	0460
Pathologie	0571
Pharmacie	0572
Pharmacologie	0419
Physiothérapie	0382
Radiologie	0574
Santé mentale	0347
Santé publique	0573
Soins infirmiers	0569
Toxicologie	0383

SCIENCES PHYSIQUES

Sciences Pures

Chimie	
Généralités	0485
Biochimie	487
Chimie agricole	0749
Chimie analytique	0486
Chimie minérale	0488
Chimie nucléaire	0738
Chimie organique	0490
Chimie pharmaceutique	0491
Physique	0494
Polymères	0495
Radiation	0754
Mathématiques	0405
Physique	
Généralités	0605
Acoustique	0986
Astronomie et astrophysique	0606
Électronique et électricité	0607
Fluides et plasma	0759
Météorologie	0608
Optique	0752
Particules (Physique nucléaire)	0798
Physique atomique	0748
Physique de l'état solide	0611
Physique moléculaire	0609
Physique nucléaire	0610
Radiation	0756
Statistiques	0463

Sciences Appliquées Et Technologie

Informatique	0984
Ingénierie	
Généralités	0537
Agricole	0539
Automobile	0540

Biomedicale	0541
Chaleur et thermodynamique	0348
Conditionnement (Emballage)	549
Génie aérospatial	0538
Génie chimique	0542
Génie civil	0543
Génie électronique et électrique	0544
Génie industriel	0546
Génie mécanique	0548
Génie nucléaire	0552
Ingénierie des systèmes	0790
Mécanique navale	0547
Métallurgie	0743
Science des matériaux	794
Technique du pétrole	0765
Technique minière	0551
Techniques sanitaires et municipales	0554
Technologie hydraulique	0545
Mécanique appliquée	0346
Géotechnologie	428
Matériaux plastiques (Technologie)	0795
Recherche opérationnelle	0796
Textiles et tissus (Technologie)	0794

PSYCHOLOGIE

Généralités	0621
Personnalité	0625
Psychobiologie	0349
Psychologie clinique	0622
Psychologie du comportement	0384
Psychologie du développement	0620
Psychologie expérimentale	062
Psychologie industrielle	0624
Psychologie physiologique	0989
Psychologie sociale	0451
Psychométrie	0632



Name _____

Dissertation Abstracts International is arranged by broad, general subject categories. Please select the one subject which most nearly describes the content of your dissertation. Enter the corresponding four-digit code in the spaces provided.

--	--	--	--

U·M·I

SUBJECT TERM

SUBJECT CODE

Subject Categories

THE HUMANITIES AND SOCIAL SCIENCES

COMMUNICATIONS AND THE ARTS

Architecture 0729
 Art History 0377
 Cinema 0900
 Dance 0378
 Fine Arts 0357
 Information Science 0723
 Journalism 0391
 Library Science 0399
 Mass Communications 0708
 Music 0413
 Speech Communication 0459
 Theater 0465

EDUCATION

General 0515
 Administration 0514
 Adult and Continuing 0516
 Agriculture 0517
 Art 0273
 Bilingual and Multicultural 0282
 Business 0688
 Community College 0275
 Curriculum and Instruction 0727
 Early Childhood 0518
 Elementary 0524
 Finance 0277
 Guidance and Counseling 0519
 Health 0680
 Higher 0745
 History of 0520
 Home Economics 0278
 Industrial 052
 Language and Literature 0279
 Mathematics 0280
 Music 0522
 Philosophy of 0998
 Physics 0523

Psychology 0525
 Reading 0535
 Religious 0527
 Sciences 0714
 Secondary 0533
 Social Sciences 0534
 Sociology of 0340
 Special 0529
 Teacher Training 0530
 Technology 0710
 Tests and Measurements 0288
 Vocational 074

LANGUAGE, LITERATURE AND LINGUISTICS

Language 0679
 General 0289
 Ancient 0290
 Linguistics 0291
 Modern
 Literature 040
 General 0294
 Classical 0295
 Comparative 0297
 Medieval 0298
 Modern 0316
 African 0591
 American 0305
 Asian 0352
 Canadian (English) 0355
 Canadian (French) 0593
 English 0311
 Germanic 0312
 Latin American 0315
 Middle Eastern 0313
 Romance 0314
 Slavic and East European

PHILOSOPHY, RELIGION AND THEOLOGY

Philosophy 0422
 Religion
 General 0318
 Biblical Studies 0321
 Clergy 0319
 History of 0320
 Philosophy of 0322
 Theology 0469

SOCIAL SCIENCES

American Studies 0323
 Anthropology 0324
 Archaeology 0326
 Cultural 0327
 Physical
 Business Administration
 General 0310
 Accounting 0272
 Banking 0770
 Management 0454
 Marketing 0338
 Canadian Studies 0385
 Economics
 General 0501
 Agricultural 0503
 Commerce Business 0505
 Finance 0508
 History 0509
 Labor 0510
 Theory 0511
 Folklore 0358
 Geography 0366
 Gerontology 0351
 History
 General 0578

Ancient 0579
 Medieval 0581
 Modern 0582
 Black 0328
 African 0331
 Asia, Australia and Oceania 0332
 Canadian 0334
 European 0335
 Latin American 0336
 Middle Eastern 0333
 United States 0337
 History of Science 0585
 Law 0398
 Political Science
 General 0615
 International Law and Relations 0616
 Public Administration 0617
 Recreation 0814
 Social Work 0452
 Sociology
 General 0626
 Criminology and Penology 0627
 Demography 0938
 Ethnic and Racial Studies 0631
 Individual and Family Studies 0628
 Industry and Labor Relations 0629
 Public and Social Welfare 063
 Social Structure and Development 070
 Theory and Methods 0344
 Transportation 0709
 Urban and Regional Planning 0999
 Women's Studies 0453

THE SCIENCES AND ENGINEERING

BIOLOGICAL SCIENCES

Agriculture
 General 0473
 Agronomy 0285
 Animal Culture and Nutrition 0475
 Animal Pathology 0476
 Food Science and Technology 0359
 Forestry and Wildlife 0478
 Plant Culture 0479
 Plant Pathology 0480
 Plant Physiology 0817
 Range Management 0777
 Wood Technology 0746
 Biology
 General 0306
 Anatomy 0287
 Biostatistics 0308
 Botany 0309
 Cell 0379
 Ecology 0329
 Entomology 0353
 Genetics 0369
 Limnology 0793
 Microbiology 041
 Molecular 0307
 Neuroscience 0317
 Oceanography 0416
 Physiology 0433
 Radiation 082
 Veterinary Science 0778
 Zoology 0472
 Biophysics
 General 0786
 Medical 0760

EARTH SCIENCES

Biogeochemistry 0425
 Geochemistry 0996

Geodesy 0370
 Geology 0372
 Geophysics 0373
 Hydrology 0388
 Mineralogy 0411
 Paleobotany 0345
 Paleocology 0426
 Paleontology 0418
 Paleozoology 0985
 Palynology 0427
 Physical Geography 0368
 Physical Oceanography 0415

HEALTH AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Environmental Science 0768
 Health Sciences
 General 0566
 Audiology 0300
 Chemotherapy 0992
 Dentistry 0567
 Education 0350
 Hospital Management 0769
 Human Development 0758
 Immunology 0982
 Medicine and Surgery 0564
 Mental Health 0347
 Nursing 0569
 Nutrition 0570
 Obstetrics and Gynecology 0380
 Occupational Health and Therapy 0354
 Ophthalmology 0381
 Pathology 0571
 Pharmacology 0419
 Pharmacy 0572
 Physical Therapy 0382
 Public Health 0573
 Radiology 0574
 Recreation 0575

Speech Pathology 0460
 Toxicology 0383
 Home Economics 0386

PHYSICAL SCIENCES

Pure Sciences
 Chemistry
 General 0485
 Agricultural 0749
 Analytical 0486
 Biochemistry 0487
 Inorganic 0488
 Nuclear 0738
 Organic 0490
 Pharmaceutical 0491
 Physical 0494
 Polymer 0495
 Radiation 0754
 Mathematics 0405
 Physics
 General 0605
 Acoustics 0986
 Astronomy and Astrophysics 0606
 Atmospheric Science 0608
 Atomic 0748
 Electronics and Electricity 0607
 Elementary Particles and High Energy 0798
 Fluid and Plasma 0759
 Molecular 0609
 Nuclear 0610
 Optics 0752
 Radiation 0756
 Solid State 0611
 Statistics 0463

Applied Sciences

Applied Mechanics 0346
 Computer Science 0984

Engineering
 General 0537
 Aerospace 0538
 Agriculture 0539
 Automotive 0540
 Biomedical 054
 Chemical 0542
 Civil 0543
 Electronics and Electrical 0544
 Heat and Thermodynamics 0348
 Hydraulic 0545
 Industrial 0546
 Marine 0547
 Materials Science 0794
 Mechanical 0548
 Metallurgy 0743
 Mining 0551
 Nuclear 0552
 Packaging 0549
 Petroleum 0765
 Sanitary and Municipal System Science 0790
 Geotechnology 0428
 Operations Research 0796
 Plastics Technology 0795
 Textile Technology 0994

PSYCHOLOGY

General 0621
 Behavioral 0384
 Clinical 0622
 Developmental 0620
 Experimental 0623
 Industrial 0624
 Personality 0625
 Physiological 0989
 Psychobiology 0349
 Psychometrics 0632
 Social 0451



Table des matières

Table des matières	i
Liste des figures	iv
Liste des tableaux	iv
Liste des abréviations	v
Résumé	viii
 Introduction	 1
A) Généralités sur les adénovirus	1
B) La protéase adénovirale	3
C) Les peptothèques sur phages filamenteux (peptide libraries)	9
D) Projet	13
 Matériel et méthodes	 16
A) Criblage des peptothèques	16
1) Criblage avec Mab73:biopanning	16
a) Biotinylation de l'anticorps	
b) Sélection des phages	
c) Amplification des phages en milieu solide	
2) Criblage avec la protéase adénovirale recombinante de Ad2	19
a) Purification de la protéase	
b) Liaison de la protéase aux billes d'agarose	

c)Sélection des phages	
d)Amplification des phages en milieu liquide	
 B)Manipulation des phages filamenteux	 21
1)Amplification d'une peptothèque primaire	21
a)Peptothèque de 6 a.a. (fd-tet)	
b)Peptothèque de 15 a.a. (M13mp19)	
c)Purification des phages	
2)Préparation des bactéries F ⁺ pour les infections	24
a)Cellules "starved" (en milieu appauvri)	
b)Cellules "starved" congelées	
3)Titration des unités de transduction (TU)	26
4)Sélection des clones isolés	26
5)Extraction de l'ADN simple brin	27
6)Séquençage de l'ADN simple brin	27
 C)Tests d'activité de la protéase adénovirale	 28
1)Préparation du substrat Ad2ts1	28
2)Test d'activité avec la protéase purifiée	29
3)Test d'activité avec la protéase liée à des billes d'agarose	29
4)Test de liaison à la protéase des phages sélectionnés	29
 Résultats	 32

A)Criblage des peptothèques avec l'anticorps M73	33
B)Criblage avec la protéase adénovirale	43
Discussion	53
Conclusion	63
Remerciements	66
Bibliographie	67
Annexe: Liste des acides aminés	74

Liste des figures

Figure no.1:Schéma général des adénovirus	2
Figure no.2:Construction d'une peptothèque	10
Figure no.3:Cartographie de la protéine E1A des Adénovirus	15
Figure no.4:Alignement des séquences en a.a. de E1A des différents sérotypes d'adénovirus	37
Figure no.5:Immunoprécipitation de mutants de délétion de E1A (12S)	41
Figure no.6:Test d'activité de la protéase liée aux billes d'agarose	45
Figure no.7:Rendements de l'élution des phages liés à la protéase adénovirale de type 2 en fonction du pH d'élution.	47
Figure no.8:Test de liaison des phages à la protéase	51

Liste des tableaux

Tableau no.1:Maladies associées aux adénovirus	4
Tableau no.2:Classification des adénovirus humains	4
Tableau no.3:Résultats du criblage de la peptothèque de 6 a.a. par l'anticorps M73	35
Tableau no.4:Résultats du criblage de la peptothèque de 15 a.a. par l'anticorps M73	38
Tableau no.5:Résumé des résultats du criblage de la peptothèque de 15 a.a. par la protéase adénovirale	49

Liste des abréviations

A: Adénine

a.a.: acides aminés

Ad: Adénovirus

ADN: acide déoxyribonucléique

Ag: Antigène

ATP: Adénine triphosphate

BSA: Albumine sérique de boeuf

C: Cytosine

CAN-1: Adénovirus canin-1

CPM: Compte par minute

DMEM: Milieu Eagle modifié par Dulbecco

D.O.: Densité optique

DTT: Dithiothréitol

EDTA: Acide éthylènediaminetétraacétique

Fab: Fragment insoluble des anticorps

G: Guanine

H2: Adénovirus humain de type 2

HIV-1: Virus de l'immunodéficience acquise humain -1

Kd: Kilo dalton

Kp.b.: Kilo paires de bases

Krpm: Kilo révolution par minute

L: Litre

M: Molaire (mole/L)

mA: Milliampère

Mab: Anticorps monoclonal

mg: Milligramme

min.: Minute

mL: Millilitre

mM: Millimolaire

mm: Millimètre

MOI: Multiplicité d'infection

NAP: Tampon chlorure de sodium et phosphate d'ammonium

nm: Nanomètre

NP40: Nonidet P-40

PBS: Tampon salin phosphate

PEG: Polyéthylène glycol

PFU: Unité de formation de plages

PNK: Polynucléotide kinase

S: Svedberg (unité de sédimentation)

SDS: Sulfate de sodium dodécyl

S.L.N.: Signal de localisation nucléaire

SSC: Tampon chlorure de sodium/citrate de sodium

T: Thymidine

TBS: Tampon salin tris

TE: Tampon tris-EDTA

ts: Thermosensible

TU: Unité de transduction

Tween-20: Polyoxyéthylène-sorbitan monolauréate

μCi : Microcurie

μg : Microgrammes

μL : Microlitre

U.V.: Ultra-violet

Vol.: Volume

Résumé:

Les peptothèques sur phages ont été utilisées pour le développement de ligands à la protéase adénovirale, pouvant potentiellement agir comme inhibiteurs de l'enzyme. Puisque la protéase est nécessaire à l'infectivité des adénovirus, un inhibiteur à cette enzyme serait très important en clinique pour bloquer leurs infections. La méthode a d'abord été testée par un criblage de deux peptothèques, l'une de 6 a.a. et l'autre de 15 a.a., avec un anticorps monoclonal, M73, qui reconnaît la protéine E1A des adénovirus de type 2 et 5. Grâce aux peptothèques, il a été déterminé que l'épitope reconnu par M73 est le signal de localisation nucléaire (S.L.N.) de la protéine, soient ses 5 derniers a.a. (Lyons et al., 1987). Des mutants de délétion dans la région C-terminale de E1A ont ensuite confirmé cette conclusion. La méthode a ensuite été adaptée pour le criblage de la peptothèque de 15 a.a. avec la protéase adénovirale purifiée. L'enzyme a été immobilisée sur des billes d'agarose et conserve son activité. Au total, 5 expériences de criblage avec la protéase ont été effectuées, dont 2 avec la protéase activée par le peptide pVI-C qui est un cofacteur de l'enzyme (Mangel et al., 1993; Webster et al., 1993). L'augmentation des rendements (phages récupérés/phages soumis au criblage) à chaque étape du criblage était significative de la spécificité de la sélection. 20 séquences différentes ont été récupérées de ces criblages, n'ayant pas d'homologie évidente entre elles. Les phages correspondants à chacune des 20 séquences, ainsi que M13 qui ne contient pas d'insert comme contrôle négatif, ont été hybridés à la protéase pour vérifier leur force de liaison. Cette expérience s'est avérée inconcluante malgré qu'un clone parmi les 20 semblait avoir une liaison plus forte que les autres avec la protéase, donc pourrait être testé pour son effet inhibiteur.

Introduction

A) Généralités sur les adénovirus

Les adénovirus (revus dans Philipson,1988;Horwitz,1990) sont associés aux infections des tissus adénoïdes et lymphoïdes, d'où leur nom. Ils ont d'abord été découverts comme agents viraux en 1953, à partir de tissus adénoïdes et d'amygdales d'enfants (Rowe et al.,1953). Ces virus sont à l'origine de maladies du système respiratoire, du système digestif ainsi que de l'oeil (voir tableau n.1).

Les adénovirus sont composés d'ADN double brin linéaire, d'environ 30 à 36 K.p.b., à l'intérieur d'une capsidie icosaédrale non-enveloppée (voir figure n.1) (Green et al.,1967;Van der Eb et al.,1969). La réplication du virus s'effectue dans le noyau, et ce en deux phases, une phase précoce et une tardive. Une protéine, TP (Terminal protein), dont 2 copies sont présentes par virus, est liée covalement aux extrémités 5' de l'ADN et est impliquée dans la réplication du virus (Rekosh et al.,1973). Les deux brins de l'ADN viral sont codants (Tooze,1981).

Il existe plus de 100 membres d'adénovirus dans la nature, dont 47 sérotypes humains (Hierholzer et al.,1991). Ces derniers sont classifiés en 7 sous-groupes selon leur potentiel oncogénique chez des rongeurs nouveaux-nés, leur homologie en ADN et leur pourcentage en G + C, ainsi que leur groupe d'hémagglutination des érythrocytes de rat et de singe (voir tableau n.2).

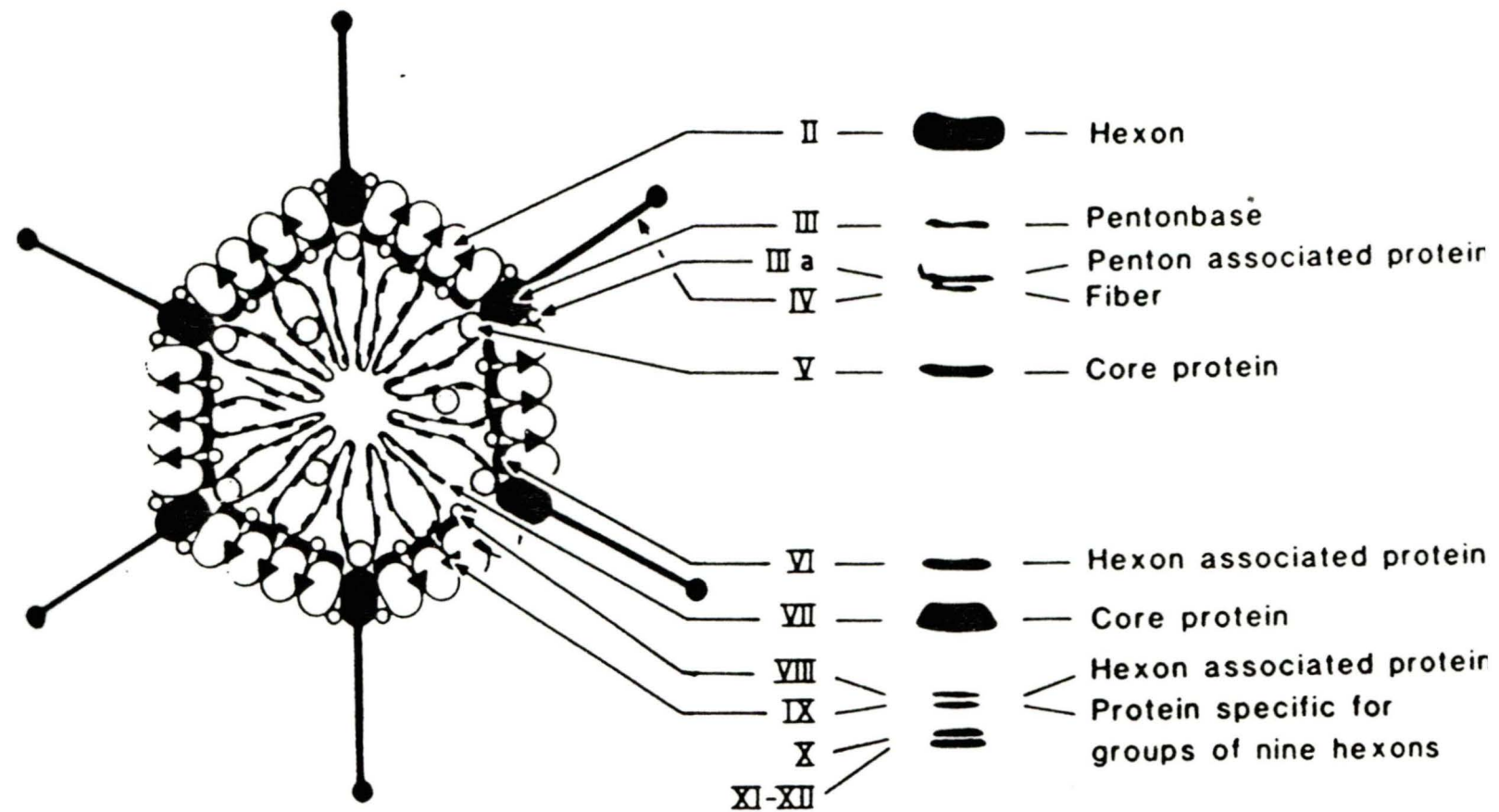


Figure no.1: Schéma général des Adénovirus.

La structure du virus ainsi que ces différentes protéines de structure sont montrés. A droite, un patron de migration des protéines virales sur gel polyacrylamide-SDS est montré. Tiré de "Philipson,L.(1988) Dans Current topics in microbiology and immunology 109: 10".

Les infections aux adénovirus, bien que rarement létales, deviennent beaucoup plus importantes chez les patients immunosupprimés, chez qui on retrouve une persistance du virus dans l'urine. Dans ces cas, le taux de mortalité est plus élevé et un traitement de chimiothérapie s'avèrerait nécessaire, la vaccination étant peu pratique dû au grand nombre de sérotypes.

B) La protéase adénovirale

La découverte en 1975 d'un mutant thermosensible de Ad2, H2ts1 ou Ad2ts1, déficient dans une fonction tardive et non infectieux lorsque produit à 39°C, a permis de mettre en évidence une fonction protéasique codée par l'adénovirus (Bégin et Weber, 1975; Weber, 1976). Il fut ainsi démontré que les protéines associées à l'ADN, soit VII, X et TP, ainsi que les protéines associées à la capside IIIa, VI et VIII sont en fait produites sous forme de précurseurs et nécessitent un clivage spécifique pour la maturation finale du virus (Anderson et al., 1973; Weber et Anderson, 1988; Anderson et al., 1989).

La mutation de H2ts1 a ensuite été localisée à la position 61,1 du génôme viral, dans l'unité de transcription tardive L3, codant pour pVI (Sung et al., 1983), l'Hexon (II) (Jornvall et al., 1981; Akusjarvi et Persson, 1981) et une protéine de 23 Kd (Akusjarvi et al., 1981). Par séquençage, on démontra qu'il s'agissait en fait d'une mutation ponctuelle, correspondant à la transition d'un C en T, ce qui change une proline en leucine dans le cadre de lecture de 612 nucléotides pour la protéine de 23 Kd, au résidu 137 (Yeh-Kai

Disease	Individuals most at risk	Principal serotypes
Acute febrile pharyngitis	Infants, young children	1, 2, 3, 5, 6, 7
Pharyngoconjunctival fever	School-age children	3, 7, 14
Acute respiratory disease	Military recruits	3, 4, 7, 14, 21
Pneumonia	Infants, young children	1, 2, 3, 7
Pneumonia	Military recruits	4, 7
Epidemic keratoconjunctivitis	Any age group	8, 11, 19, 37
Pertussis-like syndrome	Infants, young children	5
Acute hemorrhagic cystitis	Infants, young children	11, 21
Gastroenteritis	Infants, young children	40, 41
Hepatitis	Infants and children with liver transplants	1, 2, 5
Persistence of virus in urinary tract	Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), other immunosuppression, and bone marrow transplant recipients	34, 35

Tableau no.1: Maladies associées aux adénovirus.

Tiré de Horwitz, M.S. (1990) Adenoviruses. Dans B.N. Fields, Virology, 2ième Ed., vol.2, p.1727.

Subgroup	Hemagglutination groups	Serotypes	Oncogenic potential		
			Tumors in animals	Transformation in tissue culture	Percentage of G + C in DNA
A	IV (little or no agglutination)	12,18,31	High	+	48-49
B	I (complete agglutination of monkey erythrocytes)	3,7,11,14,16,21,34, 35	Moderate	+	50-52
C	III (partial agglutination of rat erythrocytes)	1,2,5,6	Low or none	+	57-59
D	II (complete agglutination of rat erythrocytes)	8,9,19,37,10,13,15, 17,19,20,22-30, 32,33,36,37,38, 39,42	Low or none	+	57-61
E	III	4	Low or none	+	57-59
F	III	40,41	Unknown		

Tableau no.2: Classification des adénovirus humains.

Les adénovirus humains sont classés selon leur groupe d'hémagglutination, leur potentiel oncogénique et leur pourcentage en G + C de leur ADN. Tiré de Horwitz, M.S., Adenoviruses. Dans B.N. Fields, Virology, 2ième Ed., col. 2, p.1685.

et al.,1983).

L'activité protéasique du virus a été détectée dans les noyaux de cellules infectées (Bhatti et Weber,1979) et associée aux matrices nucléaires et à la chromatine virale (Everitt et Ingelman,1984;Khittoo et al.,1986). Le site de clivage reconnu par la protéase de Ad2 a été proposé comme étant: (I,M,L) X G X ↓ G et (I,M,L) X G G ↓ X , (voir l'index pour les abréviations des acides aminés) où ↓ indique l'endroit du clivage (Webster et al.,1989;Anderson,1990).

Le gène correspondant à la protéine de 23 Kd de Ad2 a été cloné dans un vecteur d'expression procaryote pour permettre la mise en évidence et la caractérisation de la protéase adénovirale (Houde et Weber,1990a;Anderson,1990). La protéine recombinante conserve son activité protéolytique, telle qu'évaluée par incubation avec des protéines précurseurs extraites du virus Ad2ts1 marquées à la température restrictive (39°C). La protéase a par la suite été purifiée, puis des anticorps ont été produits contre cette protéine pour en faciliter l'étude et l'identification. De cette façon, on a déterminé qu'environ 10 copies de la protéase sont encapsidées dans les virus de type sauvage, alors que l'on n'en retrouve aucune dans le virus mutant Ad2ts1 (Anderson,1990;Rancourt et al.,en préparation).

Une douzaine de protéases adénovirales de différents sérotypes humains et animaux ont été séquencées jusqu'à présent. Cette étude montre que la protéase de l'adénovirus est très conservée dans l'évolution (93,6% pour les types les plus rapprochés

à 54,5% pour les types les plus éloignés), mais n'a pas d'homologie évidente avec d'autres protéines connues. Seulement 2 cystéines sont complètement conservées dans tous les sérotypes, soient la Cys₁₀₄ et la Cys₁₂₂ (Cai et Weber,1993b). A l'aide d'inhibiteurs spécifiques, il a été démontré que cette enzyme est une protéase à cystéine (Webster et al.,1989;Tihanyi et al.,1993). Une caractérisation du site actif par mutagenèse dirigée a par la suite confirmé cette classification et mis en évidence l'implication de l'histidine 54 et de la cystéine 104 dans l'activité de la protéase (Rancourt et al.,sous presse).

De plus, deux cofacteurs de la protéase adénovirale ont été récemment découverts. L'un d'eux est le peptide de 11 a.a. clivé par la protéase dans la partie C-terminale de pVI de Ad2 (pVI-C). Ce peptide activateur est très spécifique, agit sous forme de dimère, et contient une cystéine qui semble essentielle à l'activation (Mangel et al.,1993;Webster et al.,1993). pVI-C est aussi conservé chez pVI de Ad12, n'ayant que deux a.a. substitués, et active aussi la protéase recombinante de Ad2 (Freimuth et Anderson,1993). L'autre cofacteur est de l'ADN, mais l'activation semble cette fois non spécifique à un type d'ADN donné, car celui-ci peut être remplacé par différentes molécules chargées négativement (Mangel et al.,1993).

D'autres évidences, en plus de l'homologie de séquence, suggèrent une conservation de l'activité protéasique dans les divers sérotypes. Par exemple, des noyaux de cellules infectées par différents sérotypes humains d'adénovirus, soient

Ad1,2,3,4,5,6,7 et 9, utilisés comme source de protéase, ont pu cliver les précurseurs de protéines de Ad2ts1, démontrant une complémentation intersérotypique pour la reconnaissance des substrats de la protéase (Houde et Weber,1990b).

Par la suite, ces résultats furent confirmés grâce à la découverte de sites de clivage de la protéase, tels que définis avec la protéase de Ad2, chez les protéines pMu et pVI de Ad12; ces protéines sont clivées "in vivo" par la protéase de Ad12 (Freimuth et Anderson,1993). De même, le gène de pVII du virus canin CAN-1 a été séquencé et la protéine correspondante contient un site de clivage; celle-ci est clivée "in vivo" pour donner le produit de poids moléculaire attendu (Cai et Weber,1993a). De plus, pVII de CAN-1 a pu être clivée par la protéase recombinante de Ad2, ce qui démontre la conservation de la fonction protéasique chez les différents sérotypes, même animaux (Cai et Weber, résultats non publiés).

L'ensemble de ces évidences suggère que les protéases de différents sérotypes sont très homologues entre elles, sans toutefois ressembler à d'autres protéases connues (Cai et Weber,1993b). La conservation des sites de clivage dans les différents sérotypes et de l'activation par pVI-C semble indiquer que toutes les protéases adénovirales agissent de façon homologue et leur activité est essentielle à l'infectivité du virus (Weber, 1990), d'où le choix de la protéase comme cible pour le développement d'agents anti-viraux contre les adénovirus. Puisque ces virus causent souvent des maladies graves, qui prennent d'autant plus d'importance chez les immunosupprimés tels les sidatiques, le

développement d'une chimiothérapie contre ces virus serait d'une grande utilité en clinique. En fait, il est probable qu'un inhibiteur de la protéase se liant par exemple très spécifiquement au site actif, pourrait inhiber tous les sérotypes humains et animaux, sans toutefois affecter les autres protéases cellulaires.

Le développement rationnel d'inhibiteurs spécifiques d'une protéase demande une grande connaissance de l'enzyme, en particulier sa structure tridimensionnelle, ce qui n'est par contre pas encore disponible pour la protéase adénovirale. Une comparaison de la séquence avec d'autres protéases homologues ayant été cristallographiées permet aussi de développer un inhibiteur (Blundell et al., 1987), mais cette méthode n'est encore une fois pas applicable à la protéase adénovirale, qui a une séquence unique. Une alternative dans ce cas serait de se tourner vers une méthode aléatoire, basée par exemple sur le criblage par la protéase d'une grande quantité de peptides différents dans l'espoir d'en ressortir quelques-uns ayant les propriétés recherchées. Ceci a d'ailleurs été effectué avec succès pour la protéase de HIV-1 à partir de tétrapeptides (Owens et al., 1991).

Une nouvelle technologie basée sur l'expression de millions de peptides par fusion avec une protéine de surface des phages filamenteux, les peptothèques sur phages (Random peptide libraries, revues dans Smith et Scott, 1993; Scott, 1992), permet ainsi de trouver entre autres des ligands à des protéines d'intérêt.

C) Les peptothèques sur phages filamenteux (peptide libraries)

Les phages filamenteux (Ff), tels que f1 (Loeb,1960;Zinder et al.,1963), fd (Marvin et Hoffmann-Berling,1963), et M13 (Hofschneider,1963), sont des phages à ADN simple brin circulaire, d'environ 6400 nucléotides (Marvin et Hohn,1969), dans une capside de forme allongée, infectant les bactéries E. coli à F-pili (F⁺) (revus dans Model et Russell,1988). La protéine pIII est une protéine mineure de capside (4-5 copies par virion), et sert à l'attachement du phage aux pilis des bactéries, ce qui permet l'injection de leur ADN dans la bactérie (Goldsmith et Koningsberg,1977). Il a aussi été démontré que les virions produits avec un insert à l'extrémité N-terminale de pIII conservent leur infectivité (Smith,1988). Cette protéine, pIII, est donc une bonne candidate pour l'insertion de peptides ou de protéines que l'on veut exposer à la surface des phages. La construction de peptothèques sur ces phages, en insérant un oligonucléotide dégénéré pouvant coder de 6 jusqu'à environ 30 a.a. dans le gène de pIII, offre alors d'immenses possibilités pour le criblage de cette peptothèque dans le but de trouver des ligands spécifiques à des protéines données (voir figure no.2).

Depuis les premiers rapports, les applications des peptothèques sur phages ont beaucoup varié. Ces constructions peuvent maintenant être vues comme une technologie très puissante pour la détermination d'interactions protéines-protéines, et bien plus encore, comme on peut le constater dans les exemples qui suivent. Les premières utilisations de cette technologie visaient principalement à identifier des épitopes reconnus par des anticorps monoclonaux (Smith,1985;Parmley et Smith,1988;de la Cruz et

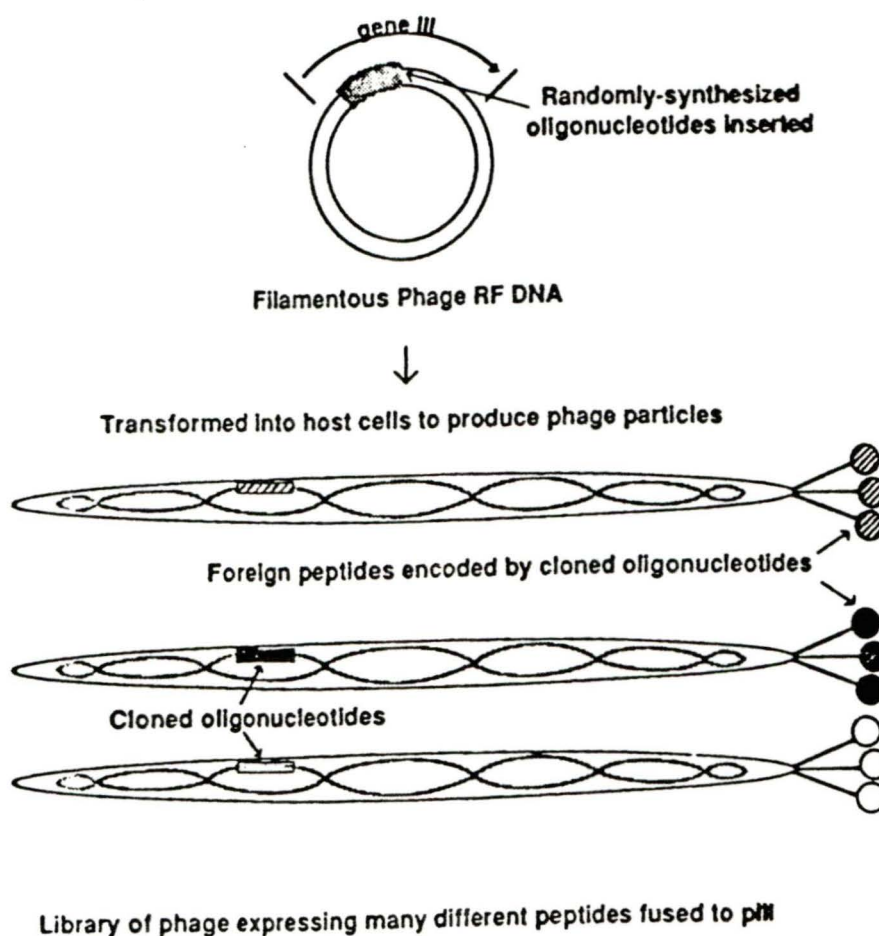


Figure no.2: Construction d'une peptothèque.

Un vecteur de phage filamenteux (M13, fd, f1) est utilisé pour cloner un oligonucléotide contenant une région dégénérée. L'insert est placé dans le cadre de lecture pour la protéine III. Le produit final est un répertoire de peptides placés à l'extrémité N-terminale des phages.

al.,1988;Scott et Smith,1990;Cwirla et al.,1990;Breitling et al.,1991;Lenstra et al.,1992;Stephen et Lane,1992;Christian et al.,1992;Adey et Kay,1993). Les peptothèques ont aussi servi à déterminer la séquence peptidique se liant à la streptavidine (Devlin et al.,1990) et à la biotine (Saggio et Laufer,1993). Par la suite, on a pu de la même manière faire l'identification de motifs reconnus par des antigènes (Ag) MHC de classe II (Hammer et al.,1992), produire des vaccins avec les phages (Smith,1993), et faire l'identification de ligands ou de dérivés de ligands de plus grande affinité pour leur récepteur (Bass et al.,1990;Lowman et al.,1991). Aussi, on a trouvé des peptides se liant à la calmoduline (Jamieson et al.,1993), à la concanavaline A (Scott et al.,1992;Oldenburg et al.,1992), ainsi qu'au galactose (Swimmer et al.,1992). De plus, l'ADN correspondant à des fragments de Fab peut être cloné dans pIII pour cribler avec un Ag particulier (Barbas III et al.,1991;McCafferty et al.,1990;Burton et al.,1991;Clackson et al.,1991). Enfin, des dérivés de l'inhibiteur de l'élastase de neutrophile avec une affinité augmentée pour cette protéase ont été trouvés à partir de l'inhibiteur naturel (Roberts et al.,1992 a et b), et des substrats de protéases (subtilisin BPN et variantes,facteur Xa) ont pu être caractérisés par immobilisation des phages et clivage dans la région dégénérée (Matthews et al., 1993).

La méthode générale pour trouver des ligands peptidiques à une protéine consiste à immobiliser celle-ci, soit en la biotinyant et en la fixant sur un pétri recouvert de streptavidine, soit en la liant directement à des billes d'agarose. La peptothèque est incubée avec la protéine immobilisée, puis les phages non liés sont lavés et par la suite

les phages qui se sont liés à la protéine sont élués avec un tampon pH 2 qui dissocie les interactions formées. Il est aussi possible de séparer les clones de différentes affinités par des lavages avec une série de tampons à pH décroissants (Roberts et al., 1992b). L'éluat est alors neutralisé, puis amplifié et soumis à un 2^{ème} tour de sélection, et ainsi de suite jusqu'à ce que le rendement de la sélection montre un enrichissement des phages spécifiques. Par séquençage de l'ADN de clones isolés, une séquence consensus est habituellement trouvée, correspondant au ligand de la protéine ayant servi au criblage.

Projet

La technologie des peptothèques sur phages peut être exploitée pour le développement d'inhibiteurs peptidiques spécifiques à la protéase adénovirale. La peptothèque de 6 a.a. de Scott et Smith (1990) ainsi que celle de 15 a.a. de Devlin et collaborateurs (1990) seront utilisées dans l'étude de la protéase de l'adénovirus.

Puisque l'application la plus documentée concerne le criblage des peptothèques par des anticorps monoclonaux, une expérience semblable sera d'abord effectuée pour tester la méthode et l'intégrité des peptothèques fournies.

L'anticorps monoclonal M73, dirigé contre la protéine E1A des adénovirus de type 2 et 5, est le plus fréquemment utilisé pour immunoprécipiter E1A (Harlow et al., 1985). L'épitope reconnu par M73 est continu car l'anticorps reconnaît la protéine native et dénaturée (Harlow et al., 1986). L'épitope a jusqu'ici été localisé dans la région C-terminale de E1A, entre les résidus 221 à 289 sur la protéine de 13S (voir figure no.3), (Kleinberger et Shenk, 1991).

Les deux peptothèques seront incubées avec l'anticorps M73 biotinylé, puis les complexes immobilisés sur un pètri recouvert de streptavidine. Après lavages, élution et neutralisation, les éluats seront amplifiés et soumis à un 2ième et 3ième tour de sélection des phages. Les éluats (output) ainsi que les phages utilisés dans la sélection à chaque

tour (input) seront titrés pour déterminer le pourcentage de rendement de chaque tour de sélection, ce qui indiquera la spécificité du criblage. Des clones isolés seront alors analysés (extraction de l'ADN puis séquençage de l'insert), la séquence sera traduite en a.a. et comparée à la séquence de E1A pour déterminer quel est l'épitope. Cette expérience, en plus de permettre de se familiariser avec cette technologie, donnera un aperçu du rendement de chaque peptothèque.

La méthode sera ensuite modifiée pour le criblage par la protéase adénovirale de type 2 purifiée, selon la technique plus récente de Roberts et collaborateurs (1992,b). La protéase sera d'abord immobilisée par liaison à des billes d'agarose. La peptothèque sera alors criblée avec la protéase activée par le peptide pVI-C ou non, mais l'élution se fera cette fois de manière à discriminer entre les clones d'affinités différentes pour la protéase, i.e. avec des tampons de pH décroissants de 6 à 2. Ces modifications ont pour but d'optimiser la sélection vers les clones de forte affinité pour la protéase, car un inhibiteur doit être très spécifique. De la même manière que décrit, l'éluat pH 2 sera amplifié et soumis à une 2^{ième} sélection et ainsi de suite jusqu'à ce qu'un titrage montre un enrichissement considérable de l'éluat pH 2 par rapport aux autres. Les clones isolés seront analysés et leur séquence en a.a. comparée au site de clivage de la protéase, dans le but de voir si le peptide se lie au site actif de la protéase. Finalement, des tests de liaison à la protéase seront effectués sur ces clones isolés pour évaluer leur spécificité puis leur potentiel inhibiteur.

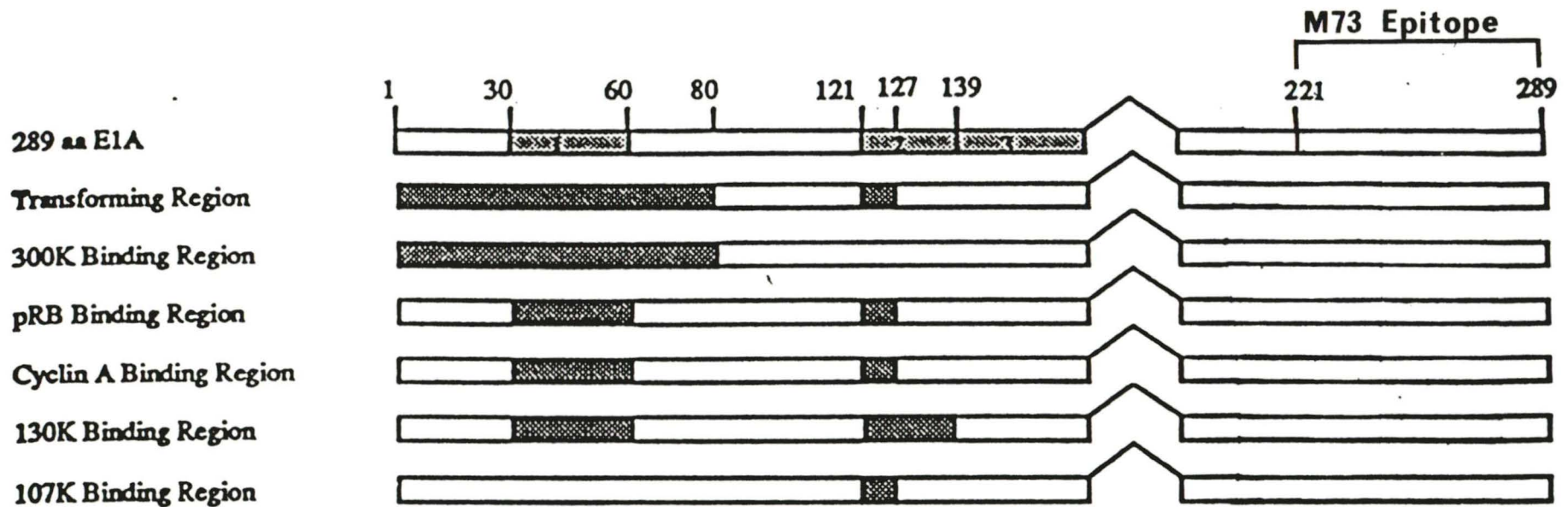


Figure no.3: Cartographie de la protéine E1A des Adénovirus.

Les différentes régions de liaison à des protéines cellulaires connues sont montrées. La protéine de 289 a.a. est le plus grand produit d'épissage de E1A. Dans cet exemple, la région de l'épitope reconnu par M73 sur E1A des adénovirus de type 2 et 5 est montrée.

Matériel et méthodes

A) Criblage des peptothèques

1) Criblage avec MAb73: Biopanning:

a) Biotinylation de l'anticorps:

L'anticorps M73 (Oncogene Sciences) a été biotinylé à l'aide du réactif de biotinylation NHS-LC-Biotin (Pierce). Ce composé réagit avec les amines primaires pour y additionner un groupement biotine. L'anticorps commercial, (environ 40 μ g), est lyophilisé jusqu'à un volume d'environ 20 μ L, puis 4 μ L de tampon NaHCO₃ 1M y sont ajoutés. Le réactif de biotinylation (1mg) est dissout dans 2 mL de solvant NaOAc 2mM, pH 6. 20 μ L de cette solution sont ajoutés à la préparation d'anticorps, et le mélange est laissé à la température de la pièce pendant 2 heures. 500 μ L de tampon éthanolamine 1M pH 9 sont ajoutés à ce mélange réactionnel pour bloquer les groupes n'ayant pas réagi et l'incubation est poursuivie pendant 2 heures. 20 μ L de BSA (50mg/mL) sont ajoutés ainsi que 1 mL de tampon TBS, puis cette solution est transférée dans un tube centricon-30 KD (Amicon) et centrifugée selon les instructions du fabricant pour éliminer la biotine libre. Après deux lavages de 2 mL chacun de tampon TBS, le culot est resuspendu dans un volume final de 200 μ L de TBS avec 0,02% de NaN₃.

b) Sélection des phages :

5 μ L de peptothèque de 6 a.a. (Scott et Smith,1990, fournie par G.P. Smith) ou 20 μ L de peptothèque de 15 a.a. (Devlin et al.,1990, fournie par Chiron corporation)

sont incubés avec 5 μ L de l'anticorps biotinylé (200 μ g/mL) 16 heures à 4°C. En même temps, un p  tri (Falcon, 60 x 15mm) de streptavidine est préparé en y ajoutant 20 μ L de streptavidine (1mg/mL) et 2 mL de NaHCO₃ 0,1 M. Le p  tri est incubé dans une boîte de plastique humidifiée, 16 heures à 4°C, pour être ensuite bloqué pendant 1 heure avant son utilisation, avec un tampon NaHCO₃ 0,1 M contenant 5mg/mL de BSA et 100 μ g/mL de streptavidine. Le p  tri est lavé 3 fois avec un tampon TBS contenant du Tween-20 à 0,5 % vol./vol.; puis le même tampon (1mL) est ajouté au mélange de peptothèque et d'anticorps et le tout pipett   sur le p  tri. Après une incubation de 10 min. avec agitation à la température de la pièce, les phages non liés au p  tri sont lavés avec 10 mL de TBS/tween-20 10 fois, sur une période d'environ 1 heure, avec agitation. Le dernier lavage est enlevé et 800 μ L de tampon d'élution (glycine-HCl, avec 1 mg/mL de BSA, pH 2.2) sont ajoutés au p  tri qui est incubé 20 min. avec agitation pour dissocier les phages liés à l'anticorps. L'éluat est enlevé et neutralisé avec 48 μ L de tampon tris 2M. L'éluat du premier tour de sélection est concentré jusqu'à 50 μ L par centrifugation sur centricon 30KD (Amicon) tel que décrit dans les instructions du fabricant, puis amplifié en milieu solide. Le premier éluat amplifié (5 μ L) est soumis à un deuxième tour de sélection comme déjà décrit. 50 μ L de l'éluat du deuxième tour de sélection sont directement amplifiés sans concentration, et un troisième tour est effectué en diminuant la concentration d'anticorps de 1000 et 10 000 fois respectivement à chaque tour pour enrichir les clones spécifiques à l'anticorps M73.

c) Amplification des phages en milieu solide:

Au départ, l'on croyait que l'amplification des phages en milieu liquide créerait une demande pour la fonction d'infectivité des phages et favoriserait certains clones par rapport à d'autres. Ainsi, on crut qu'il était préférable d'amplifier en milieu solide pour favoriser la diversité des clones, mais le groupe de Cwirla (1990) a eu de bons résultats en amplifiant en milieu liquide.

50 μ L d'éluat et 50 μ L de bactéries "starved" (section 2.a) sont incubés à 37°C 10 min. sans agitation, dans un tube de 15 mL. 2 mL de milieu 2xYT (Sambrook et al., 1989) sont ajoutés au tube, avec 0,2 μ g/mL de tétracycline (Lederle) pour la peptothèque de 6 a.a. ou 0,5 μ g/mL d'ampicilline (Ayerst) pour la peptothèque de 15 a.a., et le tube est incubé 30 min. à 37°C avec une agitation vigoureuse. Le produit de l'infection est ensuite étalé sur 3 grands pétris (150 x 15mm, Fischer) de 2xYT contenant de l'agar à 1,5% et 20 μ g/mL de tétracycline (peptothèque de 6 a.a.) ou 50 μ g/mL d'ampicilline (peptothèque de 15 a.a.). Les pétris sont incubés à 37°C de 24 à 48 heures. Un total de 30 mL de TBS est ensuite versé sur les pétris, les colonies sont grattées et la suspension transférée dans un tube "oak ridge" de 40 mL stérile. Les phages sont purifiés par deux centrifugations à 5 et 10 Krpm 10 min. dans un rotor SS34, en transférant le surnageant dans un nouveau tube à chaque fois. Le surnageant est ensuite chauffé à 70°C 30 min., puis recentrifugé, et le volume net du surnageant final est calculé. 0,15 volume d'une solution de PEG/NaCl (16,7%, 3.3 M) est ajouté au surnageant, puis le mélange est agité et incubé sur glace au moins 4 heures. Le précipité

de PEG est centrifugé à 17 Krpm 30 min. dans un rotor SS34 à 4°C, puis le surnageant est complètement enlevé et le culot est resuspendu dans 1 mL de tampon TBS. Après transfert dans un tube de 1,5 mL, les bactéries restantes sont centrifugées quelques minutes dans une microcentrifugeuse, le surnageant clair est transféré dans un nouveau tube, 150 μ L de PEG/NaCl sont ajoutés et le tube est agité et incubé sur glace au moins 2 heures. Le précipité est alors centrifugé 15 min. dans une microcentrifugeuse à 4°C et le culot est finalement resuspendu dans 100 μ L de TBS contenant 0,02 % de NaN₃. Cette suspension constitue l'éluat amplifié et est utilisée (5 μ L) pour un autre tour de sélection.

2) Criblage avec la protéase adénovirale recombinante de Ad2.

a) Purification:

La protéase recombinante peut être exprimée à partir du vecteur pLPV et purifiée par différentes méthodes chromatographiques tel que décrit (Tihanyi et al., 1993; Rancourt et al., 1993), sauf qu'à la dernière étape de purification, la protéase est éluée avec un tampon borate 0,1M pH 8,5, contenant 10% de glycérol, 0,5mM de DTT et 0,2mM de EDTA (tampon de couplage). La protéase éluée est concentrée à environ 150 à 250 μ g par mL sur centricon 10KD (Amicon).

b) Liaison de la protéase aux billes d'agarose:

Environ 500 μ g à 1mg de protéase pure de Ad2 (section A.2.a) sont liés par mL de billes d'agarose (reacti-gel 6x, Pierce). Les billes sont préalablement lavées 3 à 5 fois

avec le tampon de couplage. La protéase concentrée est ajoutée au gel, le tube est fermé sous azote et incubé tel que décrit dans les instructions du fabricant, environ 30 heures avec rotation à 4°C. Puis, les sites n'ayant pas réagi sont bloqués avec un tampon tris 0,1 M, pH 8,5 pendant 2 à 4 heures. Les billes sont ensuite lavées plusieurs fois avec un tampon phosphate 20mM pH 6,5, 10% glycérol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA avec 150 mM NaCl (tampon PBS). La protéase liée au gel est entreposée à 4°C dans une suspension de billes de 50% vol./vol. sous azote, et semble stable pour au moins 2 semaines environ. L'activité de la protéase liée aux billes est testée pour vérifier l'intégrité de l'enzyme après ce traitement (section D.3).

c) Sélection des phages:

40 μ L d'une suspension de billes 50% vol./vol. sont prélevés et lavés avec le tampon PBS avant le criblage de la peptothèque. 5 μ L de la peptothèque de 15 a.a. amplifiée (section B.1.b) sont ajoutés aux billes, et le mélange est incubé 16 heures à 4°C avec rotation pour garder les billes en suspension. Le criblage avec la protéase activée se fait de la même manière, sauf que le peptide pVI-C (excès molaire d'environ 50 fois) est ajouté à la protéase et le mélange est incubé 1 heure avant d'ajouter les phages. 0,5 mL de tampon PBS avec BSA (1mg/mL) est ajouté et l'incubation est prolongée un autre 5 min. avec rotation. Les phages non liés sont lavés à la température de la pièce, ou à 4°C lorsque mentionné et pour la protéase activée, avec 0,5 mL de tampon PBS contenant 0,5% de tween-20 10 fois en agitant 5 min. entre chaque lavage, puis les phages liés sont élués par deux lavages de 5 min. chacun, avec 0,5 mL de

tampon citrate (0,1M, 10% glycérol, 1mM DTT et 0,5mM EDTA, NaCl 150mM, BSA 1mg/mL) aux pH 6.0, 5.0, 4.0, 3.0 et 2.0. Les deux éluats d'un même pH sont regroupés, neutralisés avec un tampon tris 3M, et titrés en duplicata en même temps que les phages utilisés pour la sélection (input) pour calculer le pourcentage de rendement de chaque éluat. L'éluat pH 2 est concentré sur centricon 30KD jusqu'à 50 μ L environ, puis amplifié en milieu liquide (section A.2.d). L'éluat amplifié est soumis à un deuxième tour de sélection, et de la même manière, les éluats pH 2 de chaque tour sont amplifiés et soumis à un autre tour de sélection jusqu'à ce qu'un titrage montre un enrichissement considérable de l'éluat pH 2 par rapport aux autres éluats.

d) Amplification des phages en milieu liquide:

L'infection se fait de la même manière que pour l'amplification en milieu solide, sauf qu'au lieu d'étaler l'infection sur des pétris, 20 mL de milieu 2xYT sont ajoutés avec 50 μ g/mL d'ampicilline (peptothèque de 15 a.a.) et le tube est incubé 16 heures à 37°C avec agitation. Le tube est ensuite centrifugé et les phages purifiés comme décrit (section A.1.c).

B) Manipulation des phages filamenteux

1) Amplification d'une peptothèque primaire:

a) Peptothèque de 6 a.a (fd-tet):

La peptothèque de 6 a.a. de Scott et Smith est construite à partir du vecteur fd-tet,

qui est défectueux pour la synthèse du brin moins (-) du phage, donc qui a une infectivité inférieure aux phages de type sauvage; le protocole pour amplifier cette peptothèque doit tenir compte de ce défaut.

Deux Erlenmeyers de 2 L contenant chacun 100 mL de terrific broth (Sambrook et al., 1989) sont inoculés avec une culture de K91Kan (Smith et Scott, 1993) ayant poussé 16 heures dans du milieu 2xYT avec 100 µg/mL de Kanamycine. Les Erlenmeyers sont agités vigoureusement à 37°C jusqu'à ce qu'une dilution de 1/10 ait une D.O.₆₀₀ d'environ 0,2. L'agitation est ralentie pour 5 min. pour laisser se régénérer les F-pilis échangés. 10 µL de peptothèque primaire (environ 10¹² particules) sont ajoutés, et une faible agitation est poursuivie pour 15 minutes supplémentaires. Les cultures sont versées dans deux Erlenmeyers de 2 L préchauffés à 37°C, contenant 1 L de 2xYT avec 0,22 µg/mL de tétracycline. Les cultures sont agitées vigoureusement 35 min. à 37°C, puis 1 mL de tétracycline (20 mg/mL) est ajouté à chaque Erlenmeyer, et l'agitation est continuée pendant 16 heures. Les phages sont ensuite purifiés comme décrit dans la section c.

b) Peptothèque de 15 a.a. (M13mp19):

Dans un tube de 40 mL, 5 mL de milieu sont inoculés avec 50 µL d'une culture de K91Kan; le tube est agité à 37°C jusqu'à ce que la culture soit trouble. 2,5 mL de cette culture sont pipetés dans un Erlenmeyer de 2 L contenant 1 L de milieu LB (Sambrook et al., 1989) préchauffé à 37°C avec 0,5 µg/mL d'ampicilline et la culture est agitée vigoureusement à 37°C jusqu'à ce qu'elle soit trouble. Entre temps, l'autre 2,5

mL de culture de K91Kan est infecté avec 200 μ L de la peptothèque de 15 a.a.(environ 10^{12} particules) et le tube est agité vigoureusement à 37°C environ 1 heure. Cette culture est ensuite pipetée dans celle de 1 L, et l'Erlenmeyer est agité vigoureusement à 37°C pendant 16 heures. Les phages sont ensuite purifiés comme décrit dans la section c.

c) Purification des phages:

Les quantités indiquées correspondent à la purification de la peptothèque de 6 a.a.; les corrections pour la peptothèque de 15 a.a. sont indiquées.

1 L d'une culture en phase stationnaire est centrifugé à 5 Krpm 10 min. à 4°C, puis le surnageant est recentrifugé à 8 Krpm 10 min. à 4°C. Le surnageant clair est versé dans des tubes à centrifuger prépesés, et le volume net est calculé. A chaque bouteille, 0,15 vol. de PEG/NaCl est ajouté et les bouteilles sont mélangées avec plusieurs inversions, et gardées sur glace au moins 4 heures. Le précipité est récupéré par une centrifugation à 8 Krpm 40 min. à 4°C et le surnageant est complètement enlevé. 10 mL de tampon TBS (tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) sont ajoutés à chaque bouteille, et le culot est dissout en agitant 30 min. à 37°C. La suspension de chaque bouteille est transférée dans un seul tube "oak ridge" et le tube est centrifugé à 10 Krpm 10 min. dans un rotor SS34. Le surnageant est versé dans un nouveau tube et 4,5 mL de PEG/NaCl sont ajoutés et le tube est incubé sur glace au moins 1 heure. Le précipité est récupéré par une centrifugation à 10 Krpm 10 min., puis dissout avec 10 mL de TBS en vortexant. La solution est versée dans un tube à centrifuger de 12 mL.

Une solution de CsCl de 31% poids/poids est préparée, d'une densité de 1,30

g/mL, en mélangeant 4,83g de CsCl avec les phages dissouts dans un tube de 12 mL à centrifugation (polyallomer); le poids net est ensuite ajusté à 10,75g. Si on purifie une culture de phage à infectivité de type sauvage (peptothèque de 15 a.a.), la quantité de CsCl est multipliée par 6 et les phages divisés en 6 tubes à centrifuger. Le tube est centrifugé à 37 Krpm 48 heures dans un rotor SB 283 à 5°C. Le tube est ensuite illuminé pour voir la bande de phage, très pâle, bleuâtre, qui est récupérée dans un nouveau tube à centrifuger de 12 mL (polyallomer); 2 à 3 bandes de phage peuvent être mises ensemble. Le tube est rempli avec du TBS, puis fermé et inversé plusieurs fois pour mélanger le contenu et centrifugé à 40 Krpm pendant 16 heures dans un rotor SB 283. Le surnageant est complètement enlevé, puis le culot est dissout dans du tampon TBS pour obtenir une concentration d'environ 2×10^{14} virions/mL (environ 2 mL/L de culture pour la peptothèque de 6 a.a, et 6 mL/L de culture pour la peptothèque de 15 a.a.), en vortexant, puis laissé 16 heures au froid et revortexé. La solution de phage est centrifugée brièvement et aliquotée dans des eppendorfs de 500 μ L. NaN_3 est ajouté aux phages à 0,02 % comme préservatif. Des dilutions du stock de phages sont titrées pour évaluer la quantité de phages amplifiés.

2) Préparation des bactéries F^+ pour les infections:

a) Cellules "starved" (en milieu appauvri):

Des bactéries K91Kan (fournies par G.P. Smith) sont inoculées dans 20 mL de milieu 2xYT contenant 100ug/mL de Kanamycine (Sigma), jusqu'à une densité optique à 600nm d'environ 0.45. L'incubation est prolongée 5 min. avec une légère agitation. Les cellules sont par la suite centrifugées à 2.2 Krpm 10min (rotor HG-4), le surnageant

est enlevé et les bactéries dans le culot sont resuspendues doucement dans 20 mL de NaCl 80mM. La suspension est ensuite agitée doucement à 37°C pendant 45 min., puis centrifugée comme précédemment. Les cellules sont resuspendues dans 1 mL de 80mM NaCl/50mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH7 stérile (tampon NAP) . Ces cellules peuvent être utilisées dans la journée même pour une infection rapide avec les phages filamenteux.

b) Cellules "starved" congelées:

Pour préparer un stock de bactéries comme en a), la même procédure est utilisée à plus grande échelle. Deux Erlenmeyers de 2L contenant chacun 500 mL de 2xYT avec Kanamycine (100ug/mL) sont inoculés avec des bactéries K91Kan, agités à 37°C jusqu'à OD_{600} de 0,3-0,4 puis l'agitation est ralentie pour un autre 5 min. d'incubation. Le contenu des Erlenmeyers est centrifugé à 2.2 Krpm 10min. sur rotor HG-4, puis le surnageant est enlevé, et les cellules resuspendues dans 125mL de NaCl 80mM , incubées avec agitation 45 min. à 37°C, centrifugées comme précédemment et le culot est gardé sur glace jusqu'à la fin de la préparation. Les cellules sont resuspendues dans 40 mL de tampon NAP, centrifugées à 2.2 Krpm 10 min. et le surnageant est enlevé complètement. Le culot est resuspendu dans 1,2 mL de tampon NAP contenant du glycérol à 10% vol/vol. Des aliquots de 50 μL sont pipetés et congelés à -80°C. Ces bactéries peuvent être utilisées en leur ajoutant 450 μL de tampon NAP en pipettant doucement pour les resuspendre et doivent être utilisées immédiatement.

3) Titrage des unités de transduction (TU):

Les peptothèques primaires ou amplifiées sont d'abord diluées à 10^{-7} - 10^{-8} , tandis que les éluats amplifiés sont dilués à 10^{-6} avec du tampon TBS stérile contenant de la gélatine (0,1 %). Les éluats sortant directement d'un tour de sélection de la peptothèque ne nécessitent pas de dilution avant d'être titrés. 10 μ L de l'éluat et 10 μ L de bactéries (section B.1.b) sont incubés 10 min. sans agitation, à la température de la pièce. 1 mL de milieu 2xYT est ensuite ajouté au tube, puis le mélange est incubé à 37°C avec agitation de 30 à 45 min.. 20 μ L des infections et de chaque dilution en série 10^{-1} et 10^{-2} sont alors déposés sur un pétri d'agar 1,5 % préalablement séché 24 à 48 heures à 37°C, et contenant 100 μ g/mL de Kanamycine, et soit 40 μ g/mL de tétracycline avec la peptothèque de 6 a.a ou 100 μ g/mL d'ampicilline avec la peptothèque de 15 a.a.. Le pétri est incubé à 37°C pendant 16 heures et les colonies (TU, transducing units) sont comptées pour chaque éluat.

4) Sélection des clones isolés:

Les infections de phages d'un troisième ou quatrième tour de sélection, après titrage, sont étalés sur un pétri d'agar 1,5 %, contenant l'antibiotique approprié, pour avoir environ une centaine de colonies isolées. 20 colonies ou plus sont piquées et transférées dans un tube stérile contenant 1 mL de milieu 2xYT. En même temps, 10 μ L d'une culture de K91Kan sont ajoutés à 1 mL de milieu 2xYT pour chaque colonie isolée, et ces cultures sont incubées pendant 2 heures à 37°C avec agitation. 10 mL de milieu 2xYT sont ensuite ajoutés à chaque culture de phage isolé ainsi que 1 mL de la

culture de bactéries K91Kan. Les tubes sont agités à 37°C de 5 à 8 heures, puis les cultures sont centrifugées à 3 Krpm 10 min. dans un rotor HG-4. Les surnageants contenant les phages isolés sont transférés dans des tubes de 15 mL stériles et entreposés à 4°C.

5) Extraction de l'ADN simple brin:

A partir de cultures de clones isolés (section B.4), l'ADN des phages est isolé avec le système "phageprep kit" de la compagnie Pharmacia, selon les directives du fabricant. La concentration d'ADN est ensuite dosée approximativement par dépôt sur un pétri d'agarose contenant du bromure d'éthidium, et en comparant avec des solutions de concentrations connues sous lumière U.V..

6) Séquençage de l'ADN simple brin:

L'ADN simple brin extrait des phages isolés est séquencé avec le système "T7 sequencing kit" de la compagnie Pharmacia, selon les directives de la compagnie. L'amorce pour le séquençage de clones isolés de la peptothèque de 6 a.a. est:

5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'

provenant de l'Université Queen's à Kingston, et correspond aux nucléotides complémentaires (brin -) aux bases 1717 à 1736 de fd-tet, et l'amorce pour la peptothèque de 15 a.a. est:

5'-ACAGACAACCCTCATAGTTAGCG-3'

fournie par le Dr Bourgaux à Sherbrooke, et correspond aux nucléotides complémentaires

(brin -) aux bases 1722 à 1744 de M13mp19.

L'hybridation des amorces sur l'ADN est effectuée à 65°C durant 5 min., puis les échantillons sont laissés à la température de la pièce environ 30 min. avant de procéder avec les réactions de séquençage. Les gels de séquençage 6 % sont préparés selon les directives du fabricant à partir du système "LKB 2010 Macrophor Sequencing System".

La migration des échantillons s'effectue à 28 mA, à 55°C, durant 2 à 3 heures.

C) Tests d'activité de la protéase adénovirale:

1) Préparation du substrat Ad2ts1:

Des cellules Hep-2 (Moore et al., 1955) sont cultivées dans des pétris de 100 mm contenant du milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) (Dulbecco et Freeman, 1959), supplémenté avec 10% de sérum de veau. Les cellules sont infectées avec le virus Ad2ts1 lorsqu'elles atteignent une confluence de 90-95 %, avec une multiplicité d'infection (MOI) de 10 unités de formation de plaque (PFU, plaque forming unit) par cellule. La concentration du sérum dans le DMEM est ensuite abaissée à 2,5%. Les cellules infectées sont incubées à 39°C pendant 20 heures puis de la méthionine- ^{35}S (Amersham) est ajoutée à 100 $\mu\text{Ci/mL}$ et les cellules sont marquées pendant 3 heures. Par la suite, 8mL de DMEM sont ajoutés aux pétris et l'incubation est poursuivie à 39°C jusqu'à la 44ième heure. Les cellules sont alors récoltées, puis lysées par 6 cycles de congélation/décongélation. Les particules virales dans le surnageant sont concentrées sur un gradient de chlorure de césium préformé (1,2-1,5g/mL) par une centrifugation à 35Krpm, 1,5 heures à 4°C, dans un rotor SB283 (Weber, 1976; Khittoo et Weber, 1977).

La bande virale, correspondant à une densité de 1,345g/mL, est récoltée par aspiration, déposée sur une solution de CsCl (1,4g/mL) et centrifugée à 27Krpm 18 heures à 4°C, sur un rotor SB 283. Les capsides sont ensuite éclatées par un traitement à la pyridine 10% pendant 30 minutes, et la solution est dialysée contre du TE 1x à 4°C.

2) Test d'activité avec la protéase purifiée:

L'activité enzymatique de la protéase purifiée est testée en l'incubant, dans un tampon pH 6.5 à 7.0, avec le substrat radioactif Ad2ts1 (10⁵ CPM) préparé comme décrit (section D.1), à 37°C pendant 18 heures. Le produit de la réaction est déposé sur un gel polyacrylamide-SDS 12,5%, et visualisé par autoradiographie.

3) Test d'activité avec la protéase liée à des billes d'agarose:

Environ 25µg de protéase liée à des billes d'agarose (section A.2.b) sont lavés dans un tampon PBS, puis le substrat Ad2ts1 marqué, préparé comme décrit précédemment, est ajouté aux billes, et le mélange est incubé à 37°C 18 heures avec rotation. Le produit de clivage est déposé sur un gel polyacrylamide-SDS 12,5% et visualisé par autoradiographie.

4) Test de liaison des phages à la protéase:

Les 20 clones isolés par sélection avec la protéase, numérotés de 1 à 20, ainsi que M13mp18 ont été amplifiés par infection puis centrifugation et précipitation au PEG 4 heures à 4°C. Les culots de phages ont été resuspendus dans 100µL de TBS et des

dilutions de ces suspensions ont été dosés par spectrophotométrie à 260nm. Une fois les dilutions ajustées pour avoir une même densité optique pour tous les phages, ceux-ci ont été déposés (100 μ L) sur un filtre de nitrocellulose ou de nylon à l'aide d'un appareil "dot-blot" (Schleicher et Schuell).

Pour la liaison des phages au nitrocellulose, la membrane ainsi qu'un papier "Whatman" ont été équilibrés avec un tampon TBS puis déposés sur l'appareil. Les puits ont été lavés 2 fois avec du tampon TBS sous vide, puis le vide a été enlevé et 100 μ L d'échantillon de phage ont été déposés dans les puits avec un vide léger pour faire pénétrer les échantillons par la suite. Les puits ont ensuite été lavés 2 fois, la membrane a été enlevée et séchée à l'air quelques minutes et placée dans un sac avec 10mL de tampon de blocage (TBS,BSA,NP40). Le blocage s'est effectué pendant 4-5 heures à la température de la pièce, puis la solution a été enlevée et remplacée par une solution fraîche contenant 50 μ L de préparation de protéase (bactéries AR/120 contenant le plasmide pLPV) et la membrane a été incubée 16 heures environ.

La solution a été enlevée puis la protéase a été révélée de la même manière que pour un "western blot" (Towbin et al.,1979).

Pour vérifier si la quantité de phages déposée sur le filtre était la même pour tous les phages, une membrane de nylon ainsi qu'un papier "Whatman" ont été mouillés avec une solution de 6X SSC (Sambrook et al., 1989) puis déposés sur l'appareil "dot blot". Les puits ont été lavés 2 fois avec du 6X SSC, puis 50 μ L de chaque phage ont été ajoutés avec un vide léger et les puits lavés avec du 6X SSC sous vide. Le filtre a ensuite été séché à 80°C pendant 2 heures puis préhybridé à 67°C 1 heure avec une solution 6X

SSC, 10X Denhardt (100X= 0,2gPVP, 0,2gFicoll, 0,2g BSA pour une solution de 10 mL), 0,2% SDS. La solution a été enlevée, puis la membrane a été rincée avec 50 mL de 6X SSC 1 min. à la température de la pièce. La membrane a ensuite été hybridée avec une solution de 6X SSC, 10X Denhardt contenant $2-5 \times 10^6$ CPM d'une sonde radioactive, en l'occurrence l'amorce utilisée pour le séquençage de la peptothèque de 15 a.a.. La sonde a été préparée en incubant 2 uL de l'amorce avec le tampon (10X) de l'enzyme T4 polynucléotide kinase (T4PNK), 1μL de DTT 1mM, 5μL de ^{32}P -ATP (Amersham), 1μL de T4PNK, 45 min. à 37°C. La réaction a été arrêtée à 65°C 10 min.. La membrane a été hybridée 1 heure à 42°C avec agitation, puis lavée avec 6X SSC à la température de la pièce. La membrane a été séchée et exposée à -70°C.

Résultats

Jusqu'à dernièrement, les méthodes utilisées pour trouver des ligands à des protéines étaient plutôt laborieuses, demandant par exemple beaucoup d'informations sur la protéine cible. Plus récemment, une nouvelle technologie pour la détermination de ligands peptidiques à différents types de molécules, soit les peptothèques sur phages (peptide libraries, revues dans Smith et Scott, 1993; Scott, 1992), a été développée. Cette méthode permet le criblage par un anticorps, un récepteur ou encore une enzyme, de millions de peptides exprimés à la surface de phages filamenteux, rapidement et sans nécessiter une grande quantité d'informations sur la protéine cible.

Dans la présente étude, la méthode des peptothèques sur phages est utilisée dans le but de trouver des ligands à la protéase adénovirale de type 2 pouvant possiblement agir comme inhibiteurs. L'activité protéolytique étant nécessaire à l'infectivité des adénovirus et étant conservée dans les différents sérotypes (Weber, 1990), le développement d'un inhibiteur à la protéase devrait être utile pour bloquer toutes infections aux adénovirus.

L'utilisation de peptothèques complexes sur phages pour le développement d'un inhibiteur à une protéase est une expérience sans précédent. Des dérivés plus spécifiques d'inhibiteurs naturels d'une protéase, l'élastase de neutrophiles bovine, ont déjà été trouvés grâce à cette méthode (Roberts et al., 1992a,b), mais aucune expérience utilisant des peptides complètement dégénérés sur des phages n'a été rapportée. Cette méthode a été utilisée en premier lieu pour

la découverte d'épitopes reconnus par des anticorps monoclonaux avant que ses applications ne se diversifient largement. Il était donc de mise de débuter par une expérience préliminaire avec un anticorps monoclonal pour tester les peptothèques fournies et la méthode de criblage en général. L'anticorps monoclonal M73, dirigé contre la protéine E1A des adénovirus de type 2 et 5 et dont l'épitope exact est encore inconnu, a été choisi pour le criblage des peptothèques de 6 a.a. (Scott et Smith, 1990) et de 15 a.a. (Devlin et al., 1990).

A) Criblage des peptothèques avec l'anticorps M73:

L'anticorps monoclonal M73 reconnaît une région dans le 2^{ième} exon de E1A de Ad2 et Ad5; ceci a été démontré par la compétition entre un fragment protéique comprenant les 68 a.a. en C-terminus de E1A (no. 221-289 sur la protéine de 13S) avec la protéine entière lors d'une immunoprécipitation. Cette région de E1A bloque l'immunoprécipitation de la protéine complète par M73 mais non par un autre anticorps contre E1A, soit R7 (Harlow et al., 1985; Kleinberger et Shenk, 1991). Il est aussi anticipé que l'épitope soit continu, c'est-à-dire qu'il s'agisse d'une séquence dans la structure primaire de la protéine et qui ne dépend pas de sa structure tridimensionnelle car même dénaturé E1A est toujours immunoprécipité par M73 (Harlow et al., 1986).

L'anticorps monoclonal M73 a été biotinylé et incubé avec la peptothèque de 6 a.a. de Scott et Smith (1990) et celle de 15 a.a. de Devlin et collaborateurs (1990). Les complexes formés entre les phages et l'anticorps ont été immobilisés sur un pètri recouvert de streptavidine.

Les phages non liés à M73 ont été lavés, puis les phages liés ont été élués par un tampon acide (pH 2.2). Les phages récupérés ont été neutralisés, puis amplifiés en milieu solide et purifiés par précipitation au PEG. Les éluats amplifiés d'un premier tour de sélection ont été soumis à un deuxième tour, puis les éluats d'un deuxième tour amplifiés et soumis à un troisième tour de sélection, de façon à enrichir les phages ayant le plus d'affinité pour M73. Dans un premier tour, la sélection est généralement plus large pour permettre de récupérer tous les phages se liant à M73, ce qui est essentiel car chaque clone est peu représenté. Après amplification de cet éluat, il y a plusieurs représentants de chaque clone, alors la spécificité de criblage devient plus importante. De cette façon, aux 2^{èmes} et 3^{èmes} tours, la quantité d'anticorps fut diminuée de 1000 et 10 000 fois respectivement par rapport au premier tour, dans le but de rendre la sélection des phages plus restrictive. Les phages des éluats des 3^{èmes} tours de sélection ont ensuite été analysés et les éluats de chaque tour ont été titrés ainsi que les phages ayant servi à la sélection (input) pour calculer le pourcentage de rendement de chaque tour.

Les résultats et les rendements pour le criblage avec la peptothèque de 6 a.a. sont montrés au tableau no.3. L'augmentation de plus de 100 fois du pourcentage de rendement entre le 2^{ème} et le 3^{ème} tour indique un enrichissement des phages spécifiquement liés à M73. Le "background" correspond au nombre de phages que l'on peut récupérer typiquement lors d'un premier tour de sélection et dont la majorité est non spécifique. L'éluat du premier tour n'est pas titré car il est entièrement utilisé pour l'amplification afin d'assurer la représentation de chaque phage sélectionné.

Isolates	Peptide sequences	Frequency ^a	Phage Titration (Tu/ml)		
			Eluates	Titre	Yield (%)
A	S-R-H-R-H-H	7	Background	-	3 x 10 ⁻⁵
B	R-L-R-H-R-H	35	1 st amplified	1.3 x 10 ¹³	
C	A-R-H-R-H-R	1	2 nd	3.0 x 10 ⁵	3.9 x 10 ⁻⁴
D	R-F-K-H-R-H	8	2 nd amplified	3.3 x 10 ¹¹	
E	R-W-H-H-R-H	1	3 rd	1.3 x 10 ⁶	6.5 x 10 ⁻²
F	R-T-R-H-R-H	1			
CONSENSUS (R,K,H)-H-R-H					

Tableau no.3: Résultats du criblage de la peptothèque de 6 a.a. par l'anticorps M73.

Après 3 tours de sélection des phages avec l'anticorps M73 biotinylé, 53 clones isolés au hasard ont été analysés. Les 6 séquences des peptides correspondants sont données, ainsi que la fréquence ou le nombre de fois qu'un peptide donné a été retrouvé sur les 53 analysés. Les titres pour chaque tour sont donnés à la droite du tableau. Le "background" est une valeur estimée selon le nombre de phages que l'on peut récupérer dans un premier tour de sélection, avant l'amplification, et qui sont en majorité non-spécifiques (Smith et Scott, 1993). Il est à noter que la séquence "B" a été retrouvée pour 3 clones différents, i.e. que 3 séquences en nucléotides différentes codent pour la même séquence en a.a.. La séquence consensus est encadrée.

Un consensus de (K/R/H)HRH a été trouvé sur les 53 clones analysés au 3^{ième} tour de sélection de la peptothèque de 6 a.a.. Il s'agit donc d'une séquence basique, qui n'est par contre pas retrouvée dans la séquence primaire de E1A de Ad2. La séquence la plus riche en résidus basiques est en fait à l'extrémité C-terminale de E1A, c'est-à-dire le signal de localisation nucléaire de E1A (S.L.N.) : KRPRP (Lyons et al.,1987)(voir la séquence à la figure no.4). Puisqu'il a déjà été déterminé que l'épitope reconnu par M73 devrait être continu, le consensus trouvé a probablement soit une certaine homologie avec le véritable épitope, ou encore s'agit-il d'un mimotope, i.e. une séquence pouvant être différente de l'épitope mais quand même reconnue par l'anticorps dû par exemple à une homologie de structure et de charge. Une certaine homologie peut en fait être observée entre le consensus trouvé (K,R,H)HRH et le S.L.N. de E1A.

Les résultats du criblage avec la peptothèque de 15 a.a. se sont avérés plus concluants après l'analyse de 21 clones (tableau no.4). Encore une fois, l'augmentation du rendement entre le 2^{ième} et le 3^{ième} tour signifie un enrichissement spécifique, comme mentionné précédemment. Bien que le consensus soit moins évident, une tendance pour une séquence riche en résidus basiques et en prolines est observée. La comparaison de ces séquences avec E1A dévoile encore une fois une homologie avec le S.L.N. de E1A. En fait, l'un des isolats du tableau no.4 est KKPRP,(Q), donc ne différant du S.L.N. de E1A que par un changement conservatif d'une arginine en lysine (voir figure no.4).

L'homologie des différents clones avec le S.L.N. varie de très forte (isolat Q) à très

CLUSTAL V multiple sequence alignment of E1a (13s)

CR1

```

H12  MRTEM-TPLVLSY----QEAD-DILEHLVDNFF-NEVPSDDDLVPSLYELYDLDVESAGEDNNEQAVNEFFPESLILAASEGLFL----PEPPVLSPV
H2   MRHIIC-HGGVIT----EEMAASLLDQLEEVLAGNLPPPSH-FEPPTLMELYDLDTAPED-PNEEAVSQIFPDSVMLAVQEGIDLLTFPPAPGSPPEP
H4   MRHLRDLPEEII----IASGSEILELVNATMGDNPEPTPFPGTSLNDLYDLEVDVPEDDPNEKAVNDLFSDAALLAAEEASSP-----SSDSD
H40  MRMLPDF-----F----TGNWDDMFQGLLETEYVDFPEPSEASEEMSLMDLFDVEVDGFEDANQEAVDGMFPERLLSEAES-----
H41  MRMLPDF-----F----TGNWDDMFQGLLEAEHPDFPEPSQAFEEISLHNLFDVELDESEGDPNEEAVDGMFPNMLSEDHSA-----
H7   MRHLRFLPQEIIS----SETGIEILEFVNTLMGDOPEPPVQFPDPPTLMOLYDLEVDGPED-PNEGAVNGFFTDSMLLADEGLDI-----NPPPE
MAV1 MSRLRLSLSSRWLAQAETRNHVEDPVYCRTPDGSPTCTAVRVVRAEVLADGTMD-----LDIVFPEAAVQAV-----FSRTPWOSTT
SA7  MRHLA-LEMISEL----LDLGLDTIDGLMTEF--RPVPAGVSHNM-SLHEMYDLDV-TGQEDENEAAVDGVFSOAMLLAAEGEIM----PNLYSPGPL
TUP  MRNW-ELSVSPSF---LELCQYVSLCESPSFS-----GPSCLNDMAPDDILG-WCDLFAEAADALFPDCLLEEVAASG-LAF-----

```

CR2 **CR3**

```

H12  C-----EPIGGECMP---QLHPEDMLLCYEMGFPCSDSEDEQD-----ENGMHVSAASAAAAADREREEFQL-DHPELPGHNCKSCSEHHRNT
H2   HLSROPEQPEQRALGPVSM---NLVPEVIDLTCHAGFPSPDDEDE-----EGEE-----FVL-DYVEHPGHGCRSCHYHRNT
H4   SSLHTP-----RHDRGEKEIP---GLKWEKMLRCYEECLPPSDDED-----EATQNAASHGVQAVS-----ESFAL-DCPPLPGHGCKSCFHRINT
H40  ---AESGSGDSGVGE-----ELLPVLDLKCIEDGLPPSDPETDEATE--AEFEAAMPTYVN--ENEN---ELVL-DCPENPGRGCRACDFHRGTS
H41  ---DSGAASGDSGVGE-----DLVEVNLDLKCYEEGLPPSGSEADEAEERAEETAVSNYVNIAGAS---QLVL-DCPENPGRGCRACDFHRGSS
H7   T-LVTPGVVVESGRGKKLP---DLGAAEMDLRCYEEGFPPSDDEDG-----ETEDSIHTAVNEGKAAAS---DVFKL-DCPELPGHGCKSCFHRNNT
MAV1 ATSAEESASTDSISSDPLISCVESEFMDLRCYEQLSPE-----SLETIEVFP-----PCSTCGGHEVWG
SA7  ---VGGGEMP---ELQPEEDLFCYEDGFPPSDSEEGEHSQVETERKMAEAAAAGAAAAARREGQDFRL-DCPSVPGHGCSGSCDYHRKTS
TUP  -----VGGGEMP---ELQPEEDLFCYEDGFPPSDSEEGEHSQVETERKMAEAAAAGAAAAARREGQDFRL-DCPSVPGHGCSGSCDYHRKTS

```

M73 Epitope

```

H12  GNTDLMCSLCYLRAYNMFIYSPVSDNEP---EPNSTL-----DGDERSPPKLGSAVPEGVIKVPVQRVTGRRR
H2   GQPDIMCSLCYMRTCGMFVYSPVSEPEPEPEPEPARPTRRKLVPAILRRPTSFSVSRECNSSDSCDGSPTSPTPEINPVVPLCPKPVAVRVG-GRR
H4   GQKAVLCALCYMRAYNHCVYSPVSDADDET-PTTEST-----LSPPEIGTSPSDNIVRPVPVRAT-GRR
H40  GNPEAMCALCYMRLTGHCIIYSPISDAEGESESQSP-----EDTDFPHPLTATPPHGIVRTIPCRVSCRRR
H41  GNPEAMCALCYMRLTGHCIIYSPISDAEGECELGSN-----EETELPCSLTATAP---VRPTPCRVSRRR
H7   GMKELLCSLCYMRMHCHFIYSPVS--DDES-PSPDST-----TSPPEIQAPAPANVCKPIPVKPKPGKR
MAV1 ---FCSLCYLRGLTGKVF-----LLRM-----
SA7  GCPEILCSLCYLRAYSNFIYSPVSDSEPD---EPDSTT-----ADSNHGSPTLRCTPPRDLPRPVVKASPGKR
TUP  GQPSILCSLCYMRLTACFVYSPVSDVEDEEPTGVAENSLKR-----QADSSLCSSSPK

```

H12	CAVESILDLIQEEEREQTVVDLSVKRPRCH-	266aa
H2	QAVECIEDLLNESGQ---PLDLSC-KRPRP-	289aa
H4	AAVECLDOLLQGGDE---PLDLCTRKRPRH-	257aa
H40	PAVECIEDLLEEDPTDE--PLNLSLKRPKCS-	249aa
H41	PAVDCIEDLLEEDPTDE--PLNLSLKRPKSS-	251aa
H7	PAVDKLEDLLEGQGG---PLDLSTRKLPRQ-	261aa
MAV1	--MSFYGSLFVSNSP-----DLFFRSAASGG	189aa
SA7	PAVNSLMDLI---EEVEQTVPLDLSLKRSRSH-	266aa
TUP	-----RFC-	162aa

Figure no.4: Alignement des séquences en a.a. de E1A des différents sérotypes d'adénovirus. Les régions conservées CR1, CR2 et CR3 sont indiquées ainsi que la région de l'épitope reconnu par E1A.

ISOLATES	PEPTIDE SEQUENCES	FREQUENCY
A	I-P-L-K-A-P-Y-P-F-K-H-L-K-R-R	1
B	E-N-R-L-V-S-W-H-R-K-P-S-T-Y-V	1
C	A-H-I-R-H-H-K-M-P-V-T-N-L-R-H	3
D	I-T-T-F-S-K-R-H-L-W-T-Y-K-L-N	1
E	D-I-R-L-T-K-R-H-L-R-H-S-H-A-V	2
F	S-V-A-R-H-K-L-P-T-H-T-L-R-R-I	1
G	S-I-S-T-M-S-H-L-K-R-H-S-H-A-V	1
H	A-S-H-T-V-K-P-R-H-H-P-T-Q-R-R	1
I	A-H-L-R-L-P-T-R-T-S-M-P-K-V-T	1
J	A-H-M-F-Q-R-S-P-F-Q-R-Y-P-N-S	2
K	T-F-A-F-H-Y-V-R-P-P-V-R-N-H-R	1
L	N-I-Q-L-H-M-H-R-H-T-R-H-K-T-E	1
M	A-H-I-R-H-H-K-M-P-V-T-T-S-A-T	1
N	S-M-N-R-H-I-L-K-R-P-Y-H-N-L-Q	1
O	A-H-Q-W-H-F-P-R-S-R-S-T-T-T-N	1
P	A-H-S-S-R-L-Y-S-P-T-I-S-K-H-R	1
Q	F-S-Y-A-H-M-K-K-P-R-P-M-S-S-F	1
Ad2,5 E1A NTS:	K-R-P-R-	

Tableau no.4: Résultats du criblage de la peptothèque de 15 a.a. par l'anticorps M73: Après 3 tours de sélection, 21 clones isolés ont été analysés. Les pourcentages de rendement étaient similaires à ceux montrés pour la peptothèque de 6 a.a., soient pour le 2^{ème} tour $9,7 \times 10^{-3}\%$ et $5,2 \times 10^{-2}\%$ pour le 3^{ème} tour. 17 séquences différentes en a.a. ont été retrouvées, chacune ne correspondant qu'à un clone (une séquence en nucléotide). Le consensus a été encadré et aligné avec le Signal de localisation nucléaire (S.L.N.) de E1A de Ad2 et 5. Il est à noter que l'isolat Q est identique au S.L.N. sauf pour une lysine remplaçant arginine à la deuxième position.

faible ou presque inexistante, mais la plupart des clones ont quand même au moins une légère homologie avec le S.L.N.. En fait, la méthode ne permettait pas de séparer les clones de différentes affinités pour l'anticorps, mais une expérience de biopanning avec un mélange égal de l'isolat Q et d'un isolat du 2ième tour de sélection ayant la séquence STLMSNGSLMPRSLV, donc n'ayant aucune homologie avec le S.L.N., a démontré que seulement l'isolat Q était récupéré après un tour de sélection (7 clones Q / 7 clones analysés au hasard), suggérant que l'isolat Q est beaucoup plus spécifique à l'anticorps M73 que l'autre clone (résultats non montrés).

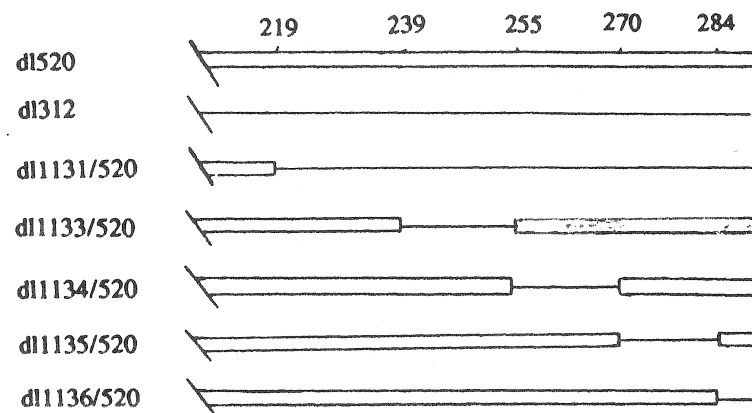
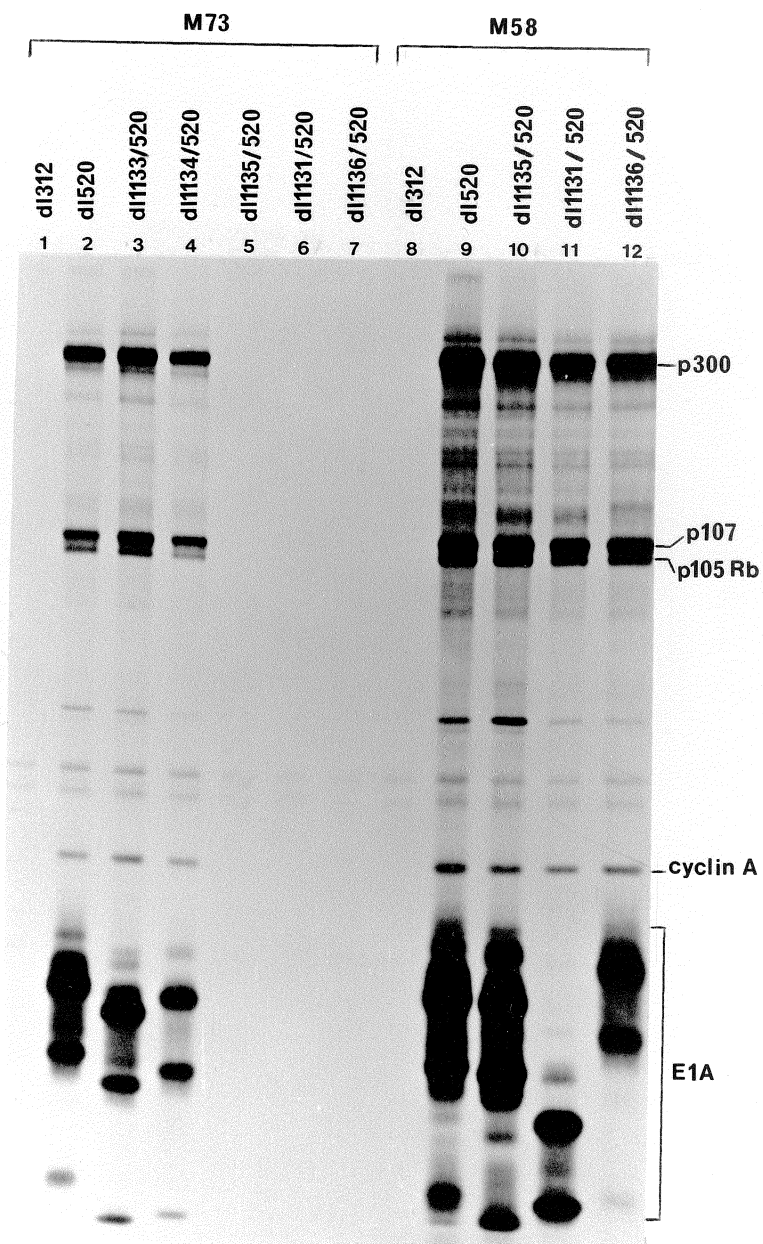
Les résultats d'une expérience complémentaire à celle décrite ont par la suite été fournis par le Dr. S. Bailey (de l'université McMaster à Hamilton, Ontario). Des mutants de délétion dans la région C-terminale de E1A (12S) ont été immunoprécipités par M73. Les mutants sont les suivants: dl312 ne produit pas de E1A, dl520 produit E1A de 243R seulement (12S), dl1133/520 est délété aux résidus 239-254 (numérotation pour la protéine de 289R), dl1134/520 est délété aux résidus 255-270, dl1135/520 est délété aux résidus 271-284, dl1131/520 est délété aux résidus 219-289 et finalement dl1136/520 est délété aux résidus 285-289 (S.L.N.); une carte de ces mutants est montrée à la figure no.5a.

Le fluorographe à la figure no.5b montre l'immunoprécipitation de E1A (12S) ainsi que des protéines cellulaires liées à E1A, i.e. p105^{Rb}, p107, p300 et cycline A. E1A migre à différentes positions sur gel dénaturant dû à plusieurs sites de phosphorylation (Whyte et al.,1988;Giordano et al.,1989). L'anticorps M58, aussi dirigé contre E1A, était utilisé comme

Figure no.5: Immunoprécipitation de mutants de délétion de E1A (12S).

A) Carte des mutants de délétion de E1A. La région C-terminale seulement est montrée, où il y a les délétions; dans dl312 le gene complet est délété. L'ensemble de la protéine E1A a déjà été montré à la figure no.3.

B) Ce fluorographe d'un gel polyacrylamide-SDS montre les produits d'immunoprécipitation de cellules HeLa marquées au ^{35}S infectées avec les différents mutants de E1A. Les positions de E1A ainsi que des protéines cellulaires qui coprécipitent avec cette protéine sont indiquées. E1A migre a différentes positions sur gel dénaturant dû à plusieurs sites de phosphorylation (Whyte et al., 1988). Les anticorps M73 et M58 sont des anticorps distincts (Harlow et al., 1985).

a**b****A****B**

contrôle positif dans ces expériences pour montrer l'expression des différents mutants.

Les protéines qui coprécipitent avec E1A ne sont récupérées que lorsque E1A est présent dans l'immunoprécipitation, ce qui démontre que les anticorps utilisés ne réagissent pas avec ces protéines cellulaires et que celles-ci interagissent spécifiquement avec E1A. Certaines protéines sont observées dans toutes les pistes et sont considérées comme le "background" dans cette expérience, réagissant non spécifiquement avec les anticorps ou la protéine A utilisés dans la technique.

L'absence d'immunoprécipitation dans les pistes 1 et 8 est due à l'absence de E1A dans le mutant dl312, comme mentionné précédemment. Le mutant dl520 produisant la protéine de 12S complète est immunoprécipité par les deux anticorps monoclonaux et sert de contrôle positif pour l'immunoprécipitation. Les mutants dl1133/520 et dl1134/520 ont aussi été immunoprécipités par M73, ce qui suggère que l'épitope n'a pas été délété dans ces mutants. Les mutants dl1135/520, dl1131/520 et dl1136/520 n'ont pas été immunoprécipités par M73 mais l'ont été par M58, démontrant qu'ils sont effectivement produits mais que la région nécessaire à la reconnaissance par M73 n'est plus accessible ou qu'elle est délétée dans ces mutants.

Selon ces résultats, un mutant dont seulement les 5 derniers a.a. de E1A (S.L.N.) sont délétés n'est plus immunoprécipité par M73 (mutant dl1136/520, piste 7 sur la figure no.5b). Ces évidences montrent que le S.L.N. de E1A est nécessaire à la reconnaissance par M73, ce

qui est en accord avec les résultats obtenus avec les peptothèques.

B) Criblage avec la protéase adénovirale:

Dans le but de découvrir des peptides se liant à la protéase adénovirale de Ad2 et pouvant agir comme inhibiteurs, la peptothèque de 15 a.a. a été criblée avec cette enzyme. Un activateur de la protéase adénovirale a récemment été découvert (Mangel et al., 1993; Webster et al., 1993); il s'agit du peptide pVI-C, qui se lie possiblement par un pont disulfure à la protéase pour l'activer. Des expériences avec et sans activateur ont été effectuées pour vérifier s'il y avait une différence entre les deux formes de l'enzyme pour lier les phages.

La protéase adénovirale de Ad2, exprimée dans un système procaryotique, a été purifiée par différentes méthodes chromatographiques (Tihanyi et al., 1993; Rancourt et al., sous presse). L'enzyme purifiée a été immobilisée par liaison à des billes d'agarose pour permettre entre autres d'utiliser de plus petits volumes d'éluant par rapport à l'immobilisation sur pétris; après ce traitement, l'activité de la protéase a été testée par incubation avec le substrat Ad2ts1 marqué. L'autoradiographie du gel polyacrylamide-SDS correspondant est présenté à la figure no.6. La première piste (WT) montre les protéines du virus de Ad2 de type sauvage marquées à la méthionine-³⁵S, et servant de marqueurs de poids moléculaire pour la protéine virale VII dont la présence témoigne de l'activité protéolytique. La piste no.1 montre le clivage de pVII en VII qui se produit lors de l'incubation d'une source de protéase avec le substrat Ad2ts1. La source

de protéase dans cet essai était la protéase recombinante de type 2 purifiée. La piste no.2 montre le clivage de pVII en VII par la protéase liée aux billes d'agarose. Les billes ont été lavées plusieurs fois avec un tampon PBS après la liaison de la protéase et avant l'incubation avec le substrat Ad2ts1 pour assurer que l'activité observée était bien due à la protéase immobilisée seulement et non à des molécules présentes dans le surnageant ou au travers des billes et n'ayant pas été enlevées. La piste no.3 montre comme contrôle négatif et marqueur de poids moléculaire de la protéine virale pVII le substrat Ad2ts1 incubé sans enzyme. L'activité enzymatique est évaluée par la conversion de pVII en VII comme mentionné, changement qui est facilement observable sur un gel polyacrylamide-SDS 12,5% dû à la différence de poids moléculaire entre les deux protéines (20KD à 18,5KD). Ce test démontre que l'activité protéolytique est conservée après liaison de la protéase aux billes d'agarose, donc l'enzyme garde son intégrité après son immobilisation et peut être utilisée pour le criblage des peptothèques. Il est important de souligner par contre qu'après liaison aux billes d'agarose, la protéase est limitée dans un environnement plus rigide et peut-être qu'un faible pourcentage seulement est bien orienté pour être actif, donc la quantité de protéase sous cette forme doit être augmentée dans un essai enzymatique pour détecter l'activité.

La peptothèque de 15 a.a. amplifiée a ensuite été criblée avec la protéase immobilisée sur les billes d'agarose, en éluant cette fois avec plusieurs tampons de pH décroissants (de 6.0 à 2.0) dans le but de séparer les phages d'affinités différentes. Deux lavages à chaque pH ont été effectués et poolés ensemble. Etant donné que l'élution se faisait en plusieurs étapes, l'immobilisation sur des billes plutôt que sur pétris est d'autant plus justifiée puisque de plus

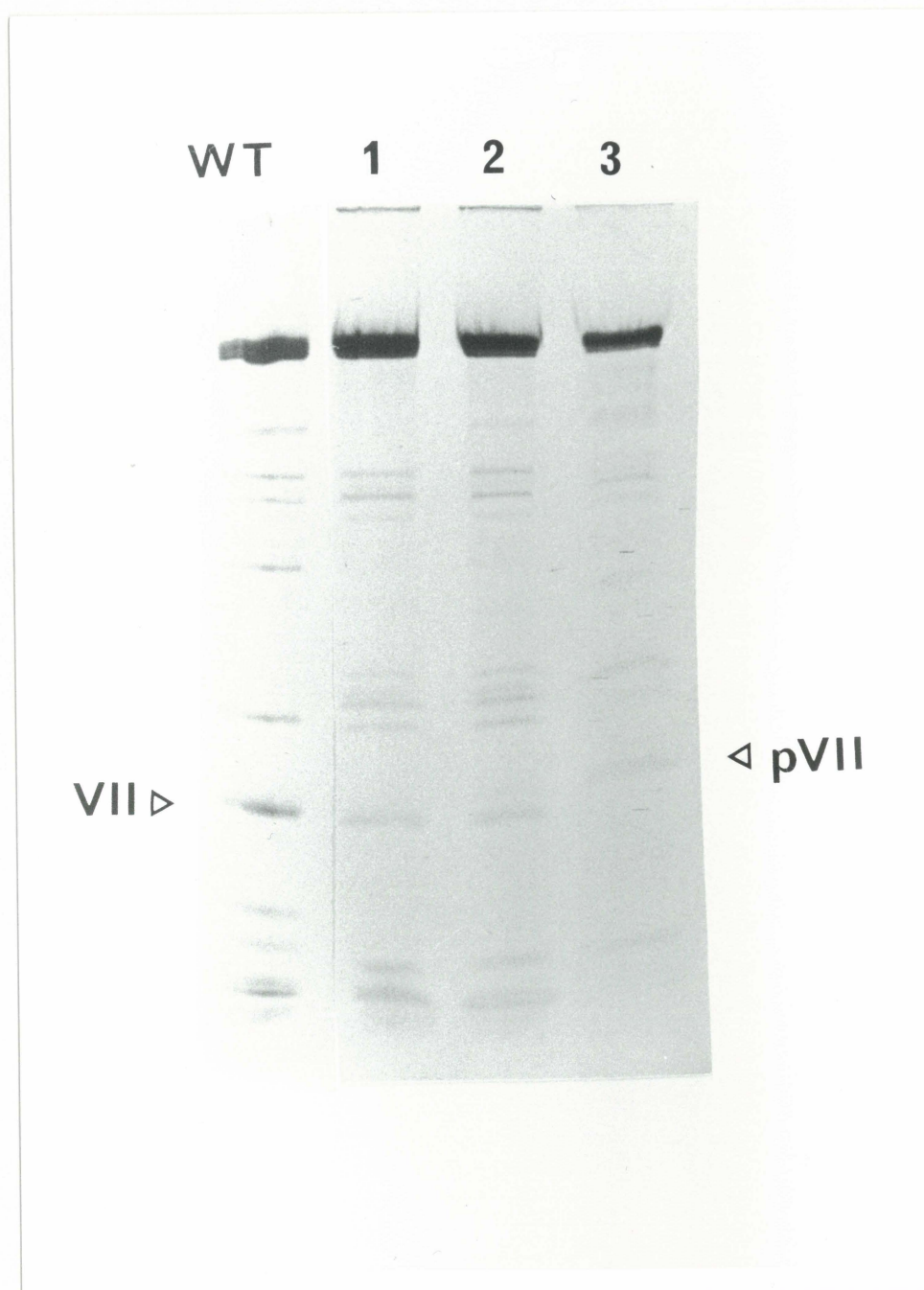


Figure no.6: Test d'activité de la protéase liée aux billes d'agarose.

Gel polyacrylamide-SDS des virus Ad2 de type sauvage (WT) et Ad2ts1 (pistes 1 à 3) marqués à la méthionine ^{35}S . La piste 1 montre le clivage de pVII en VII après incubation du substrat avec la protéase recombinante purifiée. La piste 2 montre que cette activité enzymatique est conservée après liaison de la protéase à des billes d'agarose. La piste 3 servait de marqueur de poids moléculaire pour la protéine pVII lorsque Ad2ts1 n'est pas incubé avec une source de protéase.

petits volumes sont nécessaires. Les éluats pH 2 regroupés et neutralisés ont été amplifiés (en milieu liquide, qui semble aussi efficace mais plus rapide que l'amplification en milieu solide) et utilisés dans les tours de sélection suivants. Les éluats de chaque tour ainsi que les phages ayant servi à la sélection (input) ont été titrés pour calculer les rendements et pour vérifier l'enrichissement de l'éluat pH 2 par rapport aux autres à chaque tour; un exemple de ces titrages est montré à la figure no.7. Les profils d'élution pour quatre tours de sélection consécutifs avec la protéase sont représentés. On peut voir inséré en haut à gauche le même graphique sans les titres du quatrième tour, ce qui permet de mieux observer le profil d'élution des premiers tours de sélection. Les rendements pour le premier tour de sélection représentent le "background" de l'expérience. Après le deuxième tour de sélection, il y avait encore beaucoup de phages non-spécifiques qui étaient élués dans les premières fractions. Au troisième tour par contre, l'éluat pH 2 est majoritaire par rapport aux autres éluats, mais pas en excès suffisant pour démontrer une réelle spécificité des phages de l'éluat pH 2 pour la protéase. Le quatrième tour de sélection montre cette fois un enrichissement significatif de l'éluat pH 2 par rapport aux autres. A chaque tour, on observe une augmentation du rendement total, ce qui témoigne d'une sélection spécifique pour les phages ayant une forte affinité pour la protéase adénovirale. Le profil décrit est celui de l'expérience no.1 et est représentatif en général pour toutes les expériences, malgré quelques variations. Dans cette expérience seulement, après le premier tour de sélection les éluats pH 2, 3 et 4 ont été poolés car on croyait que plusieurs phages pouvaient être importants dans ces éluats; étant donné la difficulté d'obtenir des phages très spécifiques à la protéase, la méthode fut tout de suite modifiée pour n'utiliser que les fractions de pH 2. Cette modification a fait qu'au deuxième tour, les titres des éluats pH 3 et 4 étaient moins élevés mais le reste du

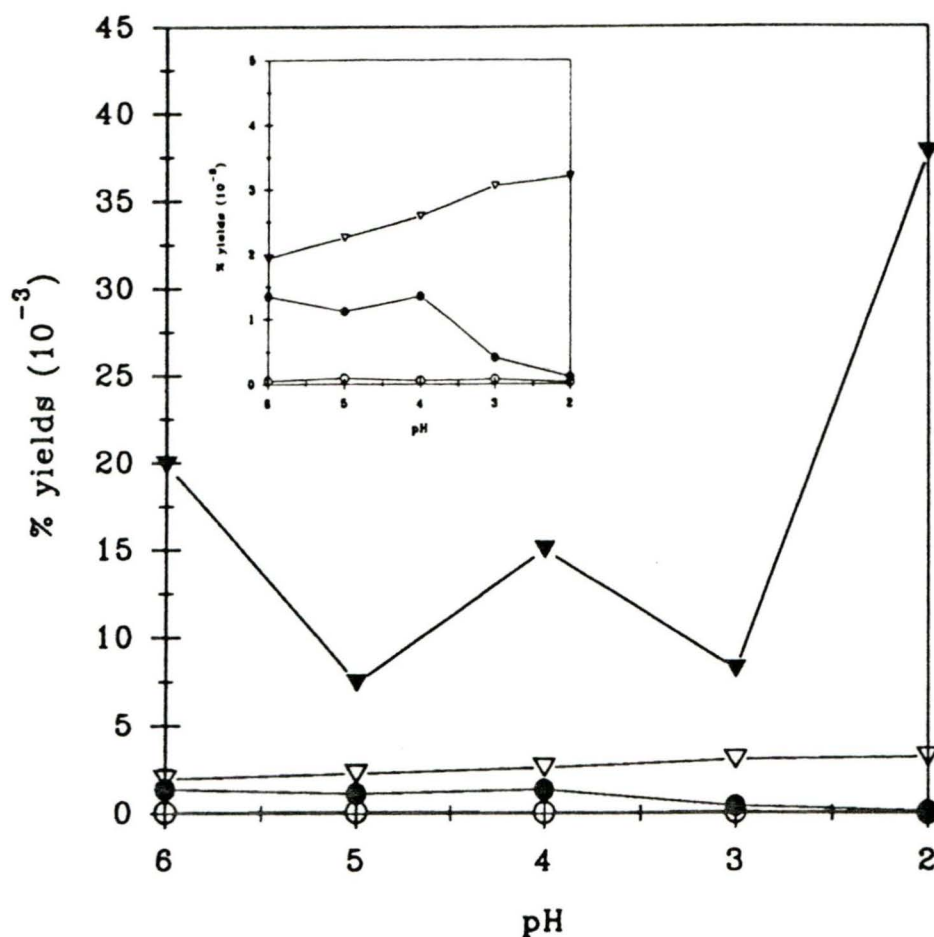


Figure no.7: Rendements de l'élution des phages liés à la protéase adénovirale de type 2 en fonction du pH d'élution.

Les phages élués à chaque tour, à chaque pH ont été titrés en même temps que les phages utilisés dans la sélection (input) pour déterminer le pourcentage de rendement pour chaque tour. Ces données sont celles de l'expérience no.1 dans laquelle au premier tour, les éluats pH 2, 3 et 4 ont été mis ensemble, amplifiés et utilisés pour un deuxième tour de sélection. Par la suite, seulement l'éluat pH 2 a été utilisé pour l'amplification. Les symboles pour les différents tours de sélection sont les suivants: ○ premier tour, ● deuxième tour, ▽ troisième tour et ▼ quatrième tour. Cette figure montre un enrichissement considérable de l'éluat pH 2 au quatrième tour de

petits volumes sont nécessaires. Les éluats pH 2 regroupés et neutralisés ont été amplifiés (en milieu liquide, qui semble aussi efficace mais plus rapide que l'amplification en milieu solide) et utilisés dans les tours de sélection suivants. Les éluats de chaque tour ainsi que les phages ayant servi à la sélection (input) ont été titrés pour calculer les rendements et pour vérifier l'enrichissement de l'éluat pH 2 par rapport aux autres à chaque tour; un exemple de ces titrages est montré à la figure no.7. Les profils d'élution pour quatre tours de sélection consécutifs avec la protéase sont représentés. On peut voir inséré en haut à gauche le même graphique sans les titres du quatrième tour, ce qui permet de mieux observer le profil d'élution des premiers tours de sélection. Les rendements pour le premier tour de sélection représentent le "background" de l'expérience. Après le deuxième tour de sélection, il y avait encore beaucoup de phages non-spécifiques qui étaient élués dans les premières fractions. Au troisième tour par contre, l'éluat pH 2 est majoritaire par rapport aux autres éluats, mais pas en excès suffisant pour démontrer une réelle spécificité des phages de l'éluat pH 2 pour la protéase. Le quatrième tour de sélection montre cette fois un enrichissement significatif de l'éluat pH 2 par rapport aux autres. A chaque tour, on observe une augmentation du rendement total, ce qui témoigne d'une sélection spécifique pour les phages ayant une forte affinité pour la protéase adénovirale. Le profil décrit est celui de l'expérience no.1 et est représentatif en général pour toutes les expériences, malgré quelques variations. Dans cette expérience seulement, après le premier tour de sélection les éluats pH 2, 3 et 4 ont été poolés car on croyait que plusieurs phages pouvaient être importants dans ces éluats; étant donné la difficulté d'obtenir des phages très spécifiques à la protéase, la méthode fut tout de suite modifiée pour n'utiliser que les fractions de pH 2. Cette modification a fait qu'au deuxième tour, les titres des éluats pH 3 et 4 étaient moins élevés mais le reste du

Clone Number	Sequence	- Activator			+ Activator	
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5
1	ASHTVKPRHHPTQRR	11/21	5/18	2/28	13/29	8/24
2	MPNFHRLKPQKRQSS	2/21	2/18	--	3/29	--
3	RPTHTTAMKFHHSKR	2/21	--	3/28	--	7/24
4	QLLAHSHRHPHSYKR	1/21	--	--	9/29	5/24
5	LPPHTNTQLQTQLMR	--	--	20/28	1/29	--
6	AHIRHHKMPVTNLRH	3/21	--	--	--	--
7	PSMHFISQVNYRSRR	1/21	--	--	--	--
8	SQMKISRKHTHQSIK	1/21	--	--	--	--
9	IPRTSMTWAQSSTKS	--	--	--	1/29	--
10	WDMKISRKHTHQSIK	--	--	--	1/29	--
11	AGNRLRNPNTNHII	--	--	--	1/29	--
12	IPRHTSKYNTPYKMT	--	1/18	--	--	--
13	SFSAPAANPSSKSRR	--	4/18	--	--	--
14	HMTIAHHYKHPANK	--	1/18	--	--	--
15	FLKAEHAHKSIRILS	--	2/18	--	--	--
16	ARYNKYHHHELIQHR	--	1/18	--	--	--
17	NSYTYLSKVHASHRR	--	2/18	--	--	--
18	KMPSMIKSMAYHYHK	--	--	--	--	3/24
19	FPNITATRKTYSRLH	--	--	--	--	1/24
20	IHYPPKKHSHPHSFRN	--	--	3/28	--	--

Tableau no.5: Résumé des résultats du criblage de la peptothèque de 15 a.a. par la protéase adénovirale.

5 expériences séparées ont été effectuées, 2 avec l'activateur pVI-C (Kemp et al., 1993; Mangel et al., 1993) et 3 sans activateur. Pour chaque expérience, le nombre de fois où le clone a été isolé sur le total analysé pour cette expérience est indiqué. 20 séquences différentes en a.a. sur les 120 clones analysés au total ont été retrouvés, chacune correspondant à un seul clone. Les 5 premiers clones en caractère gras ont été retrouvés dans plus d'une expérience. Les tirets indiquent lorsqu'un clone particulier n'a pas été retrouvé dans cette expérience.

1 est le seul ayant été retrouvé dans toutes les expériences, ce qui peut signifier que ce phage est très spécifique à la protéase. Les clones no. 2 à 5 ont été retrouvés à la fois dans les expériences avec et sans activateur. Ceci peut indiquer comme pour le clone no. 1 que ces phages se fixent assez spécifiquement à la protéase mais indépendamment de l'activation par pVI-C, donc probablement à des sites différents de pVI-C sur la protéase. Aussi, aucun des clones trouvés n'ont d'homologie entre eux.

Pour vérifier la spécificité de la liaison entre les phages retrouvés et la protéase, une expérience d'hybridation de la protéase avec les différents phages immobilisés sur un filtre de nitrocellulose a été effectuée. La protéase a été détectée avec des anticorps polyclonaux spécifiques et avec la protéine A iodinée, qui reconnaît les immunoglobulines. Après exposition du filtre, on pouvait observer des différences dans l'intensité du signal selon les différents phages (voir figure no.8a). Les phages avaient préalablement été dosés par la mesure de leur absorbance à 260 nm. Un léger signal, plus faible que pour les autres, est détecté avec le phage M13 qui était utilisé comme contrôle négatif. En même temps, une autre expérience pour vérifier si la quantité de phages était la même pour tous les échantillons a été effectuée. Les phages ont été déposés sur un filtre de nylon dans des conditions dénaturantes, et leur ADN a été hybridé avec une sonde radioactive correspondant à l'amorce utilisée pour le séquençage des phages. Le résultat de l'hybridation de l'ADN avec cette sonde montre qu'en général, les phages ont des concentrations assez semblables, mais que M13 est beaucoup plus faible que les autres (figure no.8b). Ainsi, il semble que la quantité du phage M13 était plus faible que les autres, alors il est normal que son signal pour l'hybridation de la protéase soit aussi plus faible que pour les

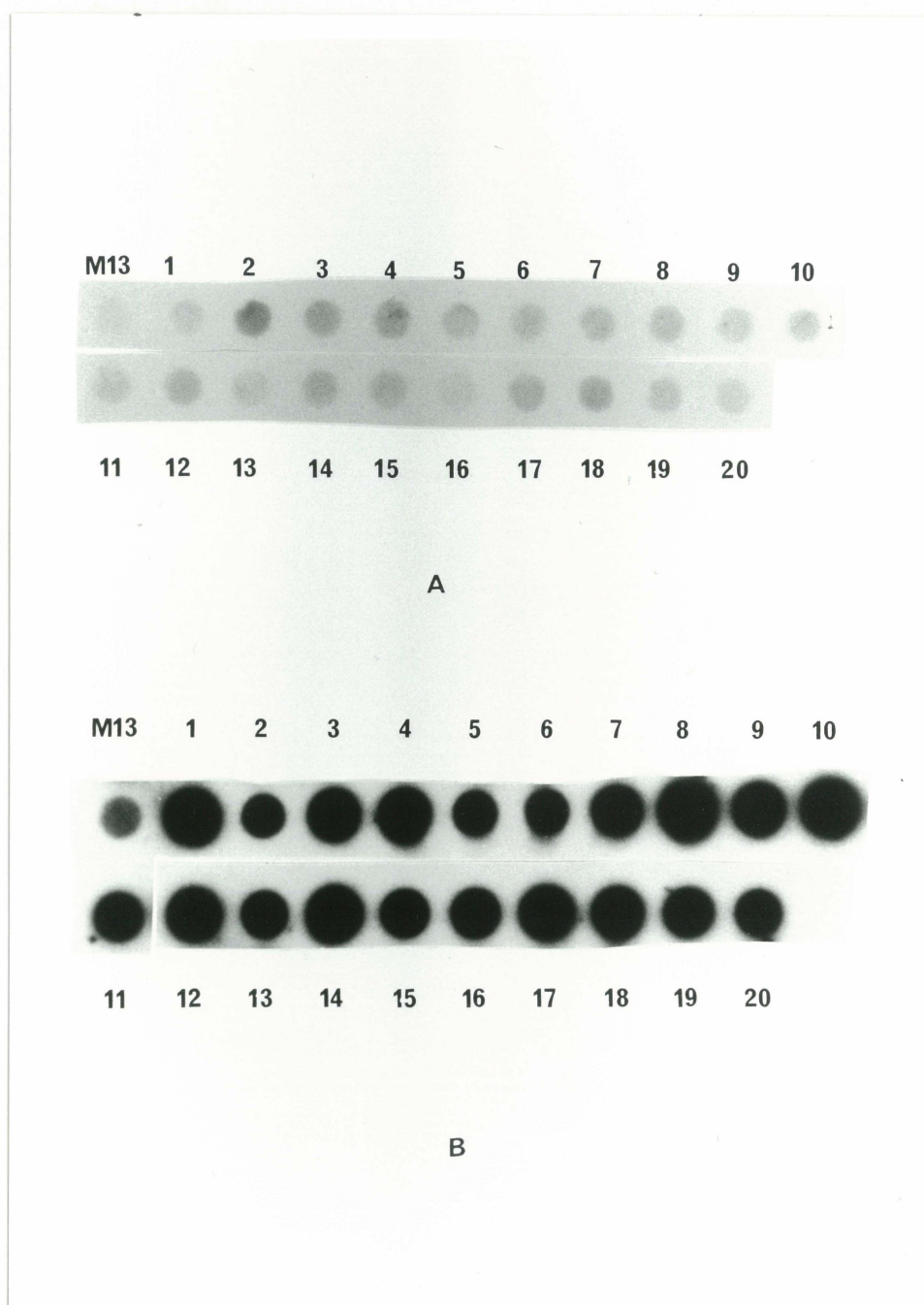


Figure no.8: Test de liaison à la protéase des clones isolés par criblage de la peptothèque de 15 a.a..

a) Les 20 clones ainsi que M13 comme contrôle négatif ont été liés à un filtre de nitrocellulose. Ce filtre a été bloqué puis hybridé avec une solution de protéase, puis avec un sérum polyclonal contre la protéase adénovirale et enfin avec de la protéine A iodée. Les dilutions ont préalablement été dosées par leur densité optique pour avoir la même quantité de phages dans chaque puit.

b) Les dilutions des phages ajustées pour avoir la même densité optique ont été déposées sur un filtre de nylon et leur ADN hybridé avec une sonde radioactive.

autres phages. L'intensité du signal de l'hybridation de M13 avec la protéase devrait donc être corrigée pour tenir compte de la quantité de phage déposée, et cette intensité corrigée doit servir de nouveau "background". On peut voir qu'ainsi, les phages ont environ une intensité semblable pour l'hybridation avec la protéase, sauf pour quelques clones pour qui l'intensité semble plus forte que les autres. Entre autres, le clone no.2 a une intensité un peu plus forte que les autres pour la liaison à la protéase, tout en ayant une intensité plus faible que les autres en général pour l'hybridation de l'ADN. Cela suggère que ce clone pourrait se fixer plus fortement que les autres à la protéase.

Discussion

L'adénovirus code pour une protéase nécessaire à son infectivité. Cette protéase clive les différents précurseurs viraux pVI, pVII, pVIII, pTP, pIIIa et pMu de façon spécifique à l'intérieur de la capside virale. Ce clivage constitue la dernière étape du cycle infectieux de l'adénovirus (Anderson et al.,1973;Weber et Anderson,1988;Anderson et al.,1989). Un mutant thermosensible de ce virus où la protéase est modifiée, Ad2ts1, n'est pas infectieux, ce qui démontre l'importance capitale de la fonction protéolytique de cette enzyme (Begin et Weber,1975; Weber,1976).

Plusieurs observations montrent l'homologie de la protéase dans les différents sérotypes d'adénovirus: leur séquence en a.a. est très homologue, les sites de clivages semblent aussi conservés et différentes sources de protéase peuvent cliver les protéines de Ad2ts1 (Cai et Weber,1993b;Houde et Weber,1990b). Aussi, il semble qu'un activateur de la protéase, pVI-C, soit aussi conservé chez différents sérotypes et est interchangeable d'un sérotype à l'autre, du moins de Ad12 à Ad2 (Freimuth et al.,1993).

Ces qualités font de la protéase adénovirale une cible adéquate pour le développement d'une chimiothérapie contre les adénovirus. Etant donné l'omniprésence de ces virus dans la nature et leur importance, particulièrement chez les enfants et les immunosupprimés, le blocage de ces infections serait utile en clinique pour nombre de maladies respiratoires et les gastroentérites.

Le développement d'un inhibiteur à une protéase virale est une idée d'autant plus intéressante dans la perspective d'être extrapolée à d'autres protéases, par exemple cellulaires ayant un rôle important dans d'autres maladies. Entre autres, certaines protéases cellulaires sécrétées sont impliquées dans la progression du cancer, notamment dans la formation de métastases (Liotta, 1990). L'application d'une technique simple et rapide pour le développement d'inhibiteurs spécifiques à différentes protéases offre alors d'énormes possibilités dans le domaine médical.

La méthode des peptothèques sur phages filamenteux offre de telles possibilités. Cette nouvelle technologie a maintenant fait ses preuves pour ce qui est de la détermination des épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux. Cette méthode a aussi été appliquée avec succès à la découverte de ligands peptidiques à différentes protéines ou même à des molécules d'une autre nature (glucides, vitamines, etc...) (Swimmer et al., 1992; Saggio et Laufer, 1993).

Le développement d'inhibiteurs d'une protéase par cette technique n'a jusqu'à maintenant jamais été documenté; par contre l'utilisation d'autres types de banques de peptides synthétiques dans ce but à déjà été réalisée avec succès pour la protéase de HIV, ce qui suggère que la méthode des peptothèques sur phages peut être tout aussi efficace (Owens et al., 1991). L'avantage de ces peptothèques sur les autres est entre autres que l'on peut régénérer les différents peptides et en faire une grande quantité avec une simple infection des phages sur des bactéries-hôtes. Ce système permet donc de cribler la

peptothèque avec une protéine d'intérêt en plusieurs étapes, en faisant une infection entre les sélections pour multiplier le nombre de phages, ce qui permet une sélection beaucoup plus spécifique des phages se liant à la protéine cible. Aussi, la synthèse d'une telle peptothèque est très simple et accessible pour les biologistes moléculaires à partir d'oligonucléotides ayant une région dégénérée; un clonage dans un vecteur de phage filamenteux suffit, alors que la synthèse d'autres banques de peptides nécessite un matériel très spécialisé. Ces phages ont aussi la propriété d'être particulièrement faciles à manipuler. Leur croissance est rapide et puisqu'ils sont déjà largement utilisés comme vecteurs de clonage pour le séquençage de l'ADN les techniques à utiliser sont faciles d'accès. L'un des désavantages par contre est que la diversité de ces peptothèques est difficilement contrôlable, mais l'utilisation simultanée de différentes peptothèques vient résoudre ce problème.

Nous avons donc voulu appliquer la technologie des peptothèques sur phages à l'étude de la protéase adénovirale. L'objectif était de trouver des peptides se liant de façon très spécifique à cette enzyme, pour tester leur effet inhibiteur par la suite.

Préalablement, il a fallu tester les rendements qu'offraient les peptothèques utilisées, soient celle de 15 a.a. et celle de 6 a.a. et ajuster la méthode selon les directives publiées en criblant les peptothèques avec un anticorps monoclonal. Ceci visait aussi à vérifier quels changements seraient nécessaires pour adapter la méthode à la protéase adénovirale.

L'anticorps choisi fut M73, un anticorps monoclonal dirigé contre E1A des adénovirus de type 2 et 5. Après le criblage de la peptothèque de 6 a.a., un consensus basique de (K,R,H)HRH a ressorti. L'augmentation des titres entre les tours de sélection ainsi que le fort consensus démontraient la spécificité du criblage. Néanmoins, cette séquence fut comparée avec celle de E1A sans reconnaître d'homologie évidente avec cette protéine, excepté pour la région du signal de localisation nucléaire (N.L.S.) à l'extrémité C-terminale de E1A qui est aussi basique. Puisque l'anticorps reconnaît la protéine à la fois native et dénaturée l'épitope doit être continu, donc il aurait dû se trouver dans la séquence primaire de E1A. Le criblage avec la peptothèque de 15 a.a. démontrait elle aussi une homologie avec le S.L.N. de E1A, KRPRP. Les signaux de localisation nucléaire sont en général basiques, avec quelques fois des prolines mais il ne semble pas y avoir de consensus très précis défini pour les décrire. L'on sait par contre que ces signaux doivent être exposés à la surface de la protéine pour se fixer à des facteurs de localisation nucléaire dans la cellule (Yamasaki et al., 1989).

Le premier consensus trouvé dans la peptothèque de 6 a.a. était en fait purement basique. Il est évidemment possible que ces séquences représentent des mimotopes, i.e. des séquences différentes de la séquence réelle de l'épitope mais quand même reconnues par M73 dues à des homologies de structures et de charges par exemple. Il est possible en fait de retrouver plusieurs mimotopes pour une séquence donnée, mais dans notre cas il est plus probable que la séquence trouvée dans la peptothèque de 6 a.a. soit simplement homologue au véritable épitope. En fait, il y avait une certaine homologie entre cette

séquence et le S.L.N.. Puisque les résultats avec la peptothèque de 15 a.a sont aussi homologues au S.L.N. de E1A, les résultats de la peptothèque de 6 a.a. confirmeraient la conclusion que l'épitope reconnu par M73 est le S.L.N..

La peptothèque de 6 a.a. est probablement plus diversifiée que l'autre dû essentiellement à sa construction. Premièrement, le fait d'avoir 6^{20} peptides possibles plutôt que 15^{20} contribue pour beaucoup à la différence entre les peptothèques, malgré que dans chacune tous les peptides possibles ne sont évidemment pas représentés pour des raisons mathématiques. Deuxièmement, le clonage de la peptothèque de 6 a.a. a nécessité un clivage des oligonucléotides par l'enzyme de restriction Bgl I. Ce clivage élimine un certain nombre de peptides que l'on croyait négligeable, mais parmi eux plusieurs séquences homologues au S.L.N. sont clivées ce qui se traduit par une sous-représentation des homologues du S.L.N. dans cette peptothèque. Il est alors fort probable que les phages récupérés lors de la sélection de cette peptothèque soient ceux ayant le plus d'homologie avec le S.L.N. dans la fraction utilisée lors de la première sélection, i.e. des séquences basiques. Puisque la méthode utilisée ne permettait pas de distinguer entre les phages se liant fortement ou faiblement à M73, d'autant plus que la bivalence d'un anticorps renforce les liaisons, il est possible que les phages trouvés avec la peptothèque de 6 a.a. ne se lient qu'avec une affinité moyenne à M73.

De même, les phages trouvés lors du criblage avec la peptothèque de 15 a.a. avaient différentes homologies avec le S.L.N. de E1A; un isolat (Q) lui était

presqu'identique alors que d'autres n'avaient que peu ou presque pas d'homologie avec cette séquence. Ces résultats peuvent être expliqués par ce qui vient d'être mentionné, i.e. que la méthode ne permettait pas de distinguer entre les affinités différentes des phages pour l'anticorps. Aussi, le consensus dans ces résultats est beaucoup moins évident que pour l'autre peptothèque; ceci serait sûrement dû à la diversité de la peptothèque de 15 a.a.. Lors de la synthèse des oligonucléotides, plusieurs possibilités de séquence ne se retrouveront pas dans la peptothèque à cause de leur trop grand nombre. Les deux peptothèques ont donc une diversité différente: celle de 6 a.a. ayant des peptides plus petits mais dont la majorité sont représentés sauf pour ceux éliminés lors du clivage, permet de retrouver un consensus donné qui correspondrait à un épitope; celle de 15 a.a. contient plus de peptides complètement différents entre eux, ce qui fait qu'elle permet moins de retrouver un consensus mais peut probablement donner un bon aperçu des différents ligands possibles pour une protéine donnée. Il semble alors justifié d'utiliser ces peptothèques en complémentarité pour avoir des résultats les plus justes possible.

Pour vérifier si l'épitope reconnu par M73 était bien le S.L.N., une série de mutants de délétion ont été immunoprécipités par cet anticorps. Un mutant dont seulement le S.L.N. de E1A est délété n'était pas immunoprécipité par M73, donc cette région fait effectivement partie de l'épitope. Aussi, le mutant dl1135/520, dont les 14 a.a. qui précèdent le S.L.N. de E1A sont délétés n'était pas immunoprécipité par M73.

Ce résultat pourrait nous porter à conclure que l'épitope chevauche la région du S.L.N. et la région adjacente, mais il est aussi possible qu'un mutant délétant la région juste avant ce signal le retienne à l'intérieur de la protéine, le rendant inaccessible.

L'ensemble des résultats présentés indique que le S.L.N. serait l'épitope reconnu par M73. Le fait que dl1135/520 n'ait pas été immunoprécipité indique que la région précédant le S.L.N. est nécessaire pour exposer ce signal à la surface de la protéine, mais que le S.L.N. seulement constituerait l'épitope reconnu par M73.

Les expériences ci-haut nous ont démontré l'utilité des peptothèques sur phages. Ces peptothèques devraient être utilisées en complémentarité pour de meilleurs résultats, mais si la méthode de criblage pouvait être plus restrictive, la peptothèque de 15 a.a donnerait peut-être des résultats préliminaires plus fiables étant donné sa plus grande diversité.

Cette méthode a par la suite été appliquée à la protéase adénovirale; des ligands de fortes affinités avec la protéase devraient pouvoir agir comme inhibiteurs de son activité enzymatique. La méthode a donc dû être modifiée pour avoir une sélection plus spécifique et pour discriminer entre les ligands d'affinités différentes.

Roberts et ses collaborateurs (1992b) ont développé une nouvelle méthode de sélection des phages, non pas d'une peptothèque dégénérée mais de dérivés d'un

inhibiteur de l'élastase de neutrophile de boeuf exprimés à la surface des phages, comme les peptides le sont habituellement dans les peptothèques. Ce groupe a effectué deux modifications principales à la technique de base: l'immobilisation de la protéine cible et l'élution des phages liés à cette protéine.

D'abord, l'immobilisation s'est faite sur des billes d'agarose, permettant de faire les complexes, lavages et éluions dans un tube "eppendorff" plutôt que dans un pétri et en utilisant de plus petits volumes à chaque étape. L'activité de la protéase immobilisée a été testée et est conservée, ce qui indique que la protéase garde son intégrité après ce traitement. L'utilisation d'une méthode d'immobilisation plus directe de la protéase plutôt que via l'interaction biotine-streptavidine était aussi préférable car on évite ainsi de récupérer des phages se fixant à la streptavidine ou à la biotine. Ensuite, l'élution a été modifiée pour séparer les phages d'affinités différentes pour la protéase, simplement en éluant avec une série de tampons de pH décroissants. Selon les résultats de Roberts et ses collaborateurs, il y a un rapport direct entre la force de la liaison des phages à la protéine cible et le pH de l'élution à laquelle on retrouve ces phages. Les plus fortes liaisons ne seraient dissociées qu'à pH très acides, i.e. pH 2 ou 3. Nous étions particulièrement intéressés à trouver des phages de très forte affinité pour la protéase, alors sauf pour l'expérience no.1, au premier tour, seulement les éluats pH 2 ont été amplifiés et soumis à d'autres tours de sélection.

Trois expériences de criblage de la peptothèque de 15 a.a. ont été effectuées avec

la protéase recombinante non activée, et deux avec la protéase activée par le peptide pVI-C pour un total de 5 expériences. Les rendements des sélections à chaque tour ont montré qu'environ 4 tours de sélection sont nécessaires pour éliminer les phages non-spécifiques à la protéase ou qui n'ont qu'une affinité moyenne à l'enzyme, et ce même pour l'expérience no.1 dans laquelle les éluats pH 2, 3 et 4 ont été poolés et amplifiés ensemble au premier tour. Les résultats obtenus de ces 5 expériences n'ont révélé aucun consensus évident parmi les 20 clones différents obtenus, mais cela peut être expliqué en partie par la diversité de la peptothèque de 15 a.a. qui a déjà été décrite. Par contre, 5 phages ont été retrouvés dans plusieurs expériences séparées, ce qui indique soit qu'ils sont plus représentés que les autres dans la peptothèque et sont plus susceptibles d'être retrouvés souvent, soit qu'ils sont vraiment spécifiques et se lient fortement à la protéase adénovirale. Toutefois, il est peu probable que ces phages soient retrouvés souvent dû à leur trop grande représentation car cela signifierait qu'ils sont non spécifiques à la protéase mais les titres des 4^{ièmes} tours montrent que la grande majorité des phages à l'éluat pH 2 sont plutôt spécifiques.

Les clones retrouvés par criblage n'ont pas non plus d'homologie avec le site de clivage de la protéase, ni avec le peptide pVI-C qui doivent théoriquement se lier à la protéase. Il est possible que ces clones se fixent à des sites différents sur la protéase, car comme toute la surface d'une protéine est immunogénique, elle est aussi sujette à la liaison des peptides, malgré que certains sites soient sûrement privilégiés. Aussi, il est possible que plusieurs de ces phages se fixent aux mêmes sites, et donc seraient des

mimotopes. Enfin, il est possible, étant donné la qualité variable de la préparation de la protéase, que certains phages se fixent à des impuretés. Cette hypothèse est toutefois moins probable et il ne pourrait s'agir que d'une minorité de phages, puisque la pureté de la protéase est d'au moins environ 90%.

Pour vérifier la force de la liaison entre les phages et la protéase, une expérience d'hybridation de la protéase aux phages immobilisés sur un filtre de nitrocellulose fut effectuée. Cette expérience a montré que le phage M13, qui était utilisé comme contrôle négatif, semblait lier la protéase presque autant que les phages sélectionnés si l'on tient compte de la correction pour la quantité de phage déposée sur le filtre. Il semble donc que dans les conditions décrites, l'expérience est en grande partie inconcluante car il devrait y avoir une différence assez importante pour la liaison à la protéase entre les phages spécifiques et M13. Par contre, on peut voir que le clone no.2 semblerait réagir un peu plus fortement que les autres phages avec la protéase, donc pourrait constituer un candidat possible pour l'inhibition de la protéase.

Il est possible que cette expérience soit inconcluante à cause de la trop faible quantité de M13 déposée sur le filtre. En effet, il est difficile de prédire si la quantité était augmentée, le signal serait-il égal ou inférieur à celui des autres phages. Cette expérience a déjà été répétée plusieurs fois, et le principal problème est qu'il est difficile d'ajuster la quantité de phages que l'on dépose sur le filtre. Même si l'on prend les densités optiques, il reste toujours une quantité variable de bactéries dans les préparations

de phages qui contribue à l'absorbance mesurée. C'est pourquoi il est nécessaire de vérifier ces quantités par hybridation de l'ADN qui est très spécifique aux phages.

Il serait donc de mise de refaire cette expérience dans d'autres conditions, jusqu'à ce qu'on ait parfaitement ajusté la quantité de phages au moins. La quantité de protéase utilisée pour l'hybridation ainsi que les temps d'hybridation sont aussi très importants pour éliminer le "background". D'autres expériences pour tester la force de liaison des phages avec la protéase doivent aussi être mises au point. Entre autres, une expérience d'immunoprécipitation de la protéase marquée en présence des différents phages a été tentée, mais pour l'instant aucune méthode de marquage de la protéase adénovirale n'est efficace. L'idéal serait bien entendu de tester la liaison et la capacité d'inhibition des différents clones avec les peptides correspondants, mais cela serait très coûteux car chacun des 20 peptides à 15 a.a.. Il serait par contre justifié de tester ainsi au moins le peptide correspondant au clone no.2, car ce dernier semble plus spécifique à la protéase que les autres et a été récupéré dans 3 expériences séparées.

Conclusion

Nous pouvons conclure que les peptothèques sur phages filamenteux sont utiles en complémentarité pour trouver un consensus de liaison à une protéine donnée lorsqu'on n'a aucune idée des ligands possibles à cette protéine. Dans le cas de la détermination de l'épitope reconnu par M73 sur la protéine E1A, cette méthode nous a permis de

conclure que le signal de localisation nucléaire de E1A constituait l'épitope recherché. Des mutants de délétion nous ont enfin donné une preuve supplémentaire de cette affirmation, et nous a indiqué que la région adjacente au S.L.N. est très importante pour rendre ce signal accessible à la surface de la protéine.

Le criblage avec la protéase adénovirale a été cette fois moins concluant. Pour démontrer la validité de nos résultats, il faut trouver des méthodes pour vérifier la force de la liaison entre les phages et la protéine, ce qui dépend surtout de la protéine étudiée. Il va sans dire que dans notre cas, il semble nécessaire de répéter l'expérience avec une autre peptothèque pour en venir à trouver idéalement un consensus. Les peptides correspondants pourront ainsi être synthétisés pour que leur effet inhibiteur sur la protéase soit testé. Entre-temps, le peptide correspondant au clone no.2 pourrait être synthétisé car il semble important. Aussi, il est possible de construire une nouvelle peptothèque ne contenant que des dérivés des peptides trouvés, de manière à déterminer la ou les séquences qui se fixent le plus fortement à la protéase adénovirale. Il est aussi possible que le criblage donne de meilleurs résultats avec des conditions d'élution moins radicales; en fait les interactions entre les enzymes et leur substrat sont toujours moins fortes que les interactions anticorps-antigènes, alors un inhibiteur pourrait être un substrat avec une affinité plus élevée pour l'enzyme dans des conditions pratiques. Les conditions de criblage décrites dans cet ouvrage sont adéquates pour un système idéal, mais il est peut-être optimiste de notre part de penser découvrir un inhibiteur très fort lors d'une expérience préliminaire.

Si le problème de la détermination de la force de liaison peut être réglé, cette méthode sera très utile pour plusieurs buts: il est possible d'utiliser cette méthode pour déterminer les sites de clivages d'une protéase donnée. Pour ce faire, il faut construire une nouvelle peptothèque avec un épitope connu juste à côté de la région dégénérée, de façon à pouvoir immobiliser cette peptothèque sur un anticorps et à cliver les complexes avec la protéase. La construction d'une telle peptothèque est présentement en cours. Aussi, d'une manière détournée, si l'on avait des anticorps monoclonaux contre la protéase, il serait possible de voir si certains d'entre eux inhibent l'activité de la protéase. On pourrait alors utiliser les peptothèques pour déterminer les épitopes que lient ces anticorps pour connaître les régions importantes à l'activité sur la protéase; l'on connaît déjà 2 résidus du site actif mais pas les résidus ou la région où le peptide activateur, pVI-C, se lie.

Enfin, si cette méthode peut être perfectionnée pour régler les problèmes rencontrés durant ce travail, entre autres la manière de tester la force de liaison, cette méthode pourra être appliquée à la découverte d'inhibiteurs de différentes protéase ou même d'autres protéines qui ont une importance dans le développement de maladies graves. Dans notre cas, trouver un inhibiteur à la protéase adénovirale permettrait de bloquer la propagation de ces virus chez les immunosupprimés et les enfants, ce qui aurait une grande importance en clinique. Il est possible qu'un tel inhibiteur puisse fonctionner aussi sur les virus des animaux, donc l'impact de cet agent antiviral s'étendrait jusqu'en agriculture. Des efforts pour la mise au point de cette technique sont

alors certainement justifiés car dans ce domaine les buts à atteindre sont nombreux et importants, et la technique des peptothèques sur phages est aussi très flexible et laisse place à l'imagination des chercheurs.

Remerciements

Je tiens premièrement à remercier le Dr Joseph M. Weber qui a dirigé les travaux entrepris durant ma maîtrise, pour ses conseils et l'expérience acquise sous sa supervision.

Je remercie aussi le Dr Karoly Tihanyi pour sa patience, ses conseils et l'aide qu'il m'a apportée, ainsi que Lyse Imbeault et Claudine Rancourt qui m'ont aussi beaucoup aidée durant ma maîtrise. Je remercie également tous les gens du laboratoire pour les nombreuses discussions à caractère scientifiques ou non, mais surtout pour l'ambiance de camaraderie qui m'a souvent supportée moralement durant les moments plus difficiles. J'en profite aussi pour remercier le Dr Louise Bouchard pour ses précieux conseils et son exemple qui m'ont beaucoup influencée; de même je remercie les gens du département et de l'entretien ménager ainsi que des différents services qui m'ont soutenus de près ou de loin, ne serait-ce que par une simple petite jasette.

Mes remerciements aux membres du jury, les Dr Weber, Guy Guillemette et Gaétan Guillemette pour la lecture de cet ouvrage qui représente beaucoup pour moi.

Enfin, je voudrais tout spécialement remercier mon ami Hassan pour son appui moral constant durant toute ma maîtrise, ainsi que mes amis et particulièrement ma famille qui m'a toujours encouragée et soutenue, que ce soit financièrement ou moralement, et qui constitue pour moi une source de motivation.

Bibliographie

Adey, N.B. et B.K. Kay. (1993) The use of random peptide libraries displayed on M13 bacteriophage to map antibody epitopes. *J. Cell. Biochem., suppl.* 17B: 228.

Akusjarvi, G. et H. Persson. (1981) Gene and m-RNA for precursor polypeptides VI from Adenovirus type 2. *J. Virol.* 38: 469-482.

Akusjarvi, G., J. Zabielski, M. Perricaudet et U. Patterson. (1981) The sequence of the 3' non coding region of the hexon mRNA discloses a novel Adenovirus gene. *Nucl. Acids Res.* 9: 1-17.

Anderson, C.W., P.R. Baum et R.F. Gesteland. (1973) Processing of adenovirus 2-induced proteins. *J. Virol.* 12: 241-252.

Anderson, C.W., (1990) The Proteinase Polypeptide of Adenovirus Serotype 2 Virions. *Virology* 177: 259-272.

Anderson, C.W, M.E. Young et S.J. Flint. (1989) Characterization of the adenovirus 2 virion protein, Mu. *Virology* 172:506-512.

Arsenault, H. et J.M. Weber .(1993) Mapping of the mAb73 epitope on Ad2 E1A proteins with random peptide libraries and deletion mutants. *FEMS microbiology letters* 114: 37-40.

Barbas III, C.F., A.S. Kang, R.A. Lerner et S.J. Benkovic. (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7978-7982.

Bass, S., R. Greene et J.A. Wells. (1990) Hormone Phage: An enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins: Struct., Fonct. Genet.* 8: 309-314.

Begin, M. et J.M. Weber. (1975) Genetic analysis of Adenovirus type 2. I. Isolation and genetic characterization of temperature-sensitive mutant. *J. Virol.* 15: 1-7.

Bhatti, A.R. et J.M. Weber. (1979) Protease of adenovirus type 2: subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 254: 12265-12268.

Blundell, T., B.L. Sibanda, M.J. Sternberg et J.M. Thornton. (1987) Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature* 326: 347-352.

Breitling, F., S. Dübel, T. Seehaus, I. Klewinghaus et M. Little. (1991) A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 104: 147-153.

Burton, D.R., C.F. Barbas III, M.A.A. Persson, S. Koenig, R.M. Chanock et R.A. Lerner. (1991) A large array of human monoclonal antibodies to type 1 immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 10134-10137.

Cai, F. et J.M. Weber. (1993a) Primary structure of the canine adenovirus pVII protein: Functional implications. *Virology* 193: 986-988.

Cai, F. et J.M. Weber. (1993b) Organization of the avian adenovirus genome and the structure of its endopeptidase. *Virology* 196: 358-362.

Christian, R.B., R.N. Zuckermann, J.M. Kerr, L. Wang et B.A. Malcolm. (1992) Simplified methods for construction, assessment and rapid screening of peptide libraries in bacteriophage. *J. Mol. Biol.* 227: 711-718.

Clackson, T., H.R. Hoogenboom, A.D. Griffiths et G. Winter. (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352: 624-628.

Cwirla, S.E., E.A. Peters, R.W. Barrett et W.J. Dower. (1990) Peptides on phage: A vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 87: 6378-6382.

de la Cruz, V.F., A.A. Lal et T.F. McCutchan. (1988) Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J. Biol. Chem.* 263(9): 4318-4322.

Devlin, J.J., L.C. Panganiban et P.E. Devlin. (1990) Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* 249: 404-406.

Dulbecco, R. et G. Freeman. (1959) Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8: 396-397.

Everitt, E. et M. Ingleman. (1984) Core and chromatin association of the adenovirus type 2 specified endoproteinase. *Microbios. Letters* 25: 75-82.

Freimuth, P. et C.W. Anderson. (1993) Human Adenovirus Serotype 12 Virion Precursors pMu and pVI Are Cleaved at Amino-Terminal and Carboxy-Terminal Sites That Conform to the Adenovirus 2 Endoproteinase Cleavage Consensus Sequence. *Virology* 193:348-355.

Giordano, A., P. Whyte, E. Harlow, B.R. Franza et D. Beach. (1989) A 60 kd cdc2-

Associated polypeptide complexes with the E1A proteins in adenovirus-infected cells. *Cell* 58: 981-990.

Goldsmith, M.E. et W.H. Konigsberg. (1977) Adsorption protein of the bacteriophage fd: Isolation, molecular properties and location in the virus. *Biochemistry* 16: 2686-2694.

Green, M., M. Pina, R. Kinnes, P.C. Wensink, L.A. MacHattie et C.A. Thomas. (1967) Adenovirus DNA. I. Molecular weight and conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57: 1308-1309.

Hammer, J., B. Takacs et F. Sinigaglia. (1992) Identification of a motif for HLA-Dr1 binding peptides using M13 display libraries. *J. Exp. Med.* 176: 1007-1013.

Harlow, ED., B.R. Franza JR. et C. Schley. (1985) Monoclonal antibodies specific for adenovirus early region 1A proteins: Extensive heterogeneity in early region 1A products. *J. Virol.* 55(3): 533-546.

Harlow, E., P. Whyte, B.R. Franza et C. Schley. (1986) Association of Adenovirus early region 1A proteins with cellular polypeptides. *Mol. Cell. Biol.* 6(5): 1579-1589.

Hierholzer, J.C., Y.O. Stone et J.R. Broderick. (1991) Antigenic relationship among 47 human adenoviruses determined in reference horse antisera. *Arch. Virol.* 121: 179-197.

Hofschneider, P.H.. (1963) Untersuchungen über kleine *E. coli* K12 bakterioophagen. 1. und 2. Mitteilung. *Z. Naturforsch B. Chem. Biochem. Biophys. Biol.* 18b:203.

Horwitz, M.S.. (1990) Adenoviruses, Dans B.N. Fields, *Virology*, 2nd Ed. vol. 2, pp. 1723-2742.

Houde, A. et J.M. Weber. (1990a) Adenovirus proteinase: Comparison of amino acid sequences and expression of the cloned cDNA in *E. coli*. *Gene* 88: 269-273.

Houde, A. et J.M. Weber. (1990b) Adenovirus type 2 precursor proteins are cleaved by proteinases of other adenoviruses. *Virology* 179: 485-486.

Jamieson, M.A. JR, M.A. Kaetzel et J.R. Dedman. (1993) Selection of calmodulin-binding peptides from a bacteriophage random peptide libraries. *J. Cell. Biochem., suppl.* 17B: 216.

Jornvall, H., G. Akusjarvi, P. Alestrom, H. Von Bahr-Lindstrom, U. Patterson, E. Apella, A. Fowler et L. Philipson. (1981) The Adenovirus hexon protein: the primary structure of the polypeptide and its correlation with the hexon gene. *J. Biol. Chem.* 256: 6181-6204.

Khittoo, G., L. Delorme, C.V. Dery, M.L. Tremblay, J.M. Weber, V. Bibor-Hardy et R. Simard. (1986) Role of the nuclear matrix in Adenovirus maturation. *Virus research* 4: 391-403.

Khittoo, G. et J. Weber. (1977) Genetic analysis of adenovirus type 2. VI. A temperature-sensitive mutant defective for DNA encapsidation. *Virology* 81(1): 126-137.

Kleinberger, T. et T. Shenk. (1991) A protein kinase is present in a complex with adenovirus E1A proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11143-11147.

Lenstra, J.A., J.H.F. Erkens, J.G.A. Langeveld, W.P.A. Posthumus, R.H. Melen, F. Gebauer, I. Correa, L. Enjuanes et K.K. Stanley. (1992) Isolation of sequences from a random sequences expression library that mimic viral epitopes. *J. Immunol. Meth.* 152: 149-157.

Liotta, L. (1990) The role of cellular proteases and their inhibitors in invasion and metastasis. *Introductory overview. Cancer & Metastasis Reviews* 9(4): 285-287.

Loeb, T.. (1960) Isolation of a bacteriophage specific for the F+ and HFr mating types of Escherichia coli K-12. *Science* 131: 932.

Lowman, H.B., S.H. Bass, N. Simpson et J.A. Wells. (1991) Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry* 30: 10832-10838.

Lyons, R.H., B.Q. Ferguson et M. Rosenberg. (1987) Pentapeptide nuclear localization signal in adenovirus E1a. *Mol. Cell. Biol.*, 7(7): 2451-2456.

Mangel, W.F., W.J. McGrath, D.L. Toledo et C.W. Anderson. (1993) Viral DNA and a viral peptide can act as cofactors of adenovirus virion proteinase activity. *Nature* 361: 274-275 .

Marvin, D.A. et H. Hoffmann-Berling. (1963) Physical and chemical properties of two new small bacteriophages. *Nature* 197: 517.

Marvin, D.A. et B. Hohn. (1969) Filamentous bacterial viruses. *Bacteriol. Rev.* 33: 172-209.

Matthews, D.J. et J.A. Wells. (1993) Substrate Phage: Selection of protease substrates by monovalent phage display. *Science* 260: 1113-1117.

McCafferty, J., A.D. Griffiths, G. Winter et D.J. Chiswell. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348: 552-554.

Model, P. et M. Russel. (1988) Filamentous bacteriophage. Dans: *The bacteriophages*,

vol. 2, Ed. R. Calendar, Plenum Press, NY, chapitre 6.

Moore, A.E., L. Sabachewski et H.W. Toolan. (1955) Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Research* 15: 598:602.

Oldenburg, K.R., D. Loganathan, I.J. Goldstein, P.G. Schultz et M.A. Gallop. (1992) Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5393-5397.

Owens, R.A., P.D. Gesellchen, B.J. Houchins et R.D. DiMarchi. (1991) The rapid identification of HIV protease inhibitors through the synthesis and screening of defined peptide mixture. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 181(1): 402-408.

Parmley, S.F. et G.P. Smith. (1988) Antibody selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73: 305-318.

Philipson, L.. (1988) Structure and Assembly of Adenoviruses. Dans *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 109: 1-52.

Rancourt, C., P. Labrecque, K. Tihanyi et J.M. Weber. (en préparation) Proline 137 is critical for adenovirus proteinase stability and encapsidation.

Rancourt, C., K. Tihanyi, M. Bourbonniere et J.M. Weber. (sous presse) Identification of active site residues of the adenovirus endopeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.

Rekosh, D.M.K., W.C. Russel, A.J.D. Bellet et A.J. Robinson. (1973) Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* 11: 283-295.

Roberts, B.L., W. Markland, A.C. Ley, R.B. Kent, D.W. White, S.K. Guterman et R.C. Ladner. (1992a) Directed evolution of a protein: Selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2429-2433.

Roberts, B.L., W. Markland, K. Siranosian, M.J. Saxena, S.K. Guterman et R.C. Ladner. (1992b) Protease inhibitor display M13 phage: selection of high-affinity neutrophil elastase inhibitors. *Gene* 121: 9-15.

Rowe, W.P., R.J. Huebner, L.K. Gilmore, R.H. Parrot et T.G. Ward. (1953) Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Med.* 84: 570-573.

Saggio, I. et R. Laufer (1993) Biotin binders selected from a random peptide library expressed on phage. *Biochemical Journal* 293: 613-616.

Sambrook J., E.F. Fritsch et T. Maniatis. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Scott, J.K. (1992) Discovering peptide ligands using epitope libraries. *TIBS* 17: 435-439.

Scott, J.K., D. Loganathan, R.B. Easley, X. Gong et I.J. Goldstein. (1992) A family of concanavalin-A binding peptides from a hexapeptide epitope library. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 5398-5402.

Scott, J.K. et G.P. Smith. (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249: 386-390.

Smith, G.P.. (1985) Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315-1317.

Smith, G.P.. (1988) Filamentous phage assembly: Morphogenetically defective mutants that do not kill the host. *Virology* 167: 156-165.

Smith, G.P.. (1993) Epitope discovery: Vaccines as drugs. *J. Cell. Biochem., suppl.* 17B: 212.

Smith, G.P. et J.K. Scott. (1993) Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Meth. Enzymol.* 217: 228-257.

Stephen, C. et D. Lane. (1992) Mutant conformation of p53. Precise epitope mapping using filamentous phage epitope library. *J. Mol. Biol.* 225: 577-583.

Sung, M.T., T.M. Cao, M.A. Lischwe et R.T. Coleman. (1983) Molecular processing of Adenovirus proteins. *J. Biol. Chem.* 258: 8266-8272.

Swimmer, C., S.M. Lehar, J. McCafferty, D.J. Chiswell, W.A. Blatter et B.C. Guild. (1992) Phage display of ricin B chain and its single bonding domain: System for screening galactose-binding mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3756-3760.

Tihanyi, K., M. Bourbonniere, A. Houde, C. Rancourt et J.M. Weber. (1993) Isolation and properties of Adenovirus Type 2 proteinase. *J. Biol. Chem.* 268(3): 1780-1785.

Tooze, J.. (1981) DNA tumor viruses. Dans *Molecular Biology of tumor Viruses*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 943-1054.

Towbin, H., T. Staehelin et J. Gordon. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc.*

Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.

Van der Eb, A.J., L.W. Van Kerkeren et E.F.J. Van Bruggen. (1969) Structural properties of adenovirus DNAs. *Biochem. Biophys. Acta* 82: 530-541.

Weber, J. (1976) Genetic analysis of adenovirus type 2 III. Temperature sensitivity of processing of viral proteins. *J. Virol.* 17, 462-471

Weber, J.M.. (1990) The adenovirus proteinase. *Sem. Virology* 1: 379-384.

Weber, J.M., and Anderson, C.W. (1988) Identification of the gene coding for the precursor of adenovirus core protein X. *J. Virol.* 62, 1741-1745

Webster, A., Russell, W.C., and Kemp, G.D. (1989) Characterization of the adenovirus proteinase; substrate specificity. *J. Gen. Virol.* 70, 3215-3223

Webster, A., Hay, R.T., and Kemp, G. (1993) The Adenovirus Protease Is Activated by a Virus-Coded Disulphide-Linked Peptide 72. *Cell*, 97-104

Whyte, P., Buchovich, K.J., Horowitz, J.M., Friend, S.H., Raybuck, M.W., Weinberg, R.A. & Harlow, E. (1988). Association between an oncogene and an anti-oncogene: The adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature (London)*, 334, 124-129.

Yamasaki, L., Kanda, P. & Lanford, R.E. (1989) Identification of four nuclear transport signal-binding proteins that interact with diverse transport signals. *Mol. Cell. Biol.*, 9(7), 3028-3036.

Yeh-Kai, L., Akusjarvi, G., Alestrom, P., Pettersson, U., Tremblay, M., and Weber, J. (1983) Genetic identification of an endoproteinase encoded by the adenovirus genome. *J. Mol. Biol.* 167, 217-222.

Annexe: Liste des acides aminés.

<i>Aminoacides</i>	<i>Abrévia- tions à 3 lettres</i>	<i>Symboli- sation par une lettre</i>
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide aspartique	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Acide glutamique	Glu	E
Glycocolle	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V